



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS**

**“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**T E S I S**

**MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIPIRÉTICA DE EXTRACTOS ACUOSOS Y PROTEICOS  
DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIA DE LA SALUD**

**Presenta**

**IBQ. ADRIÁN GÓMEZ BALTAZAR**

**Directora de tesis:**

**D. C. BERTHA FENTON NAVARRO**



**Agosto 2014**

**Este trabajo de tesis 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-UMSNH 16.2-2013, 2014.**

**COMITÉ TUTORAL:**

**D. C. LUZ TORNER AGUILAR**

**D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL**

**M. C. VÍCTOR MANUEL FARIÁS RODRÍGUEZ**

**D.C. SERGIO GUTIÉRREZ CASTELLANOS**

## DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Papá y mamá

## AGRADECIMIENTOS

A la D. C. Bertha Fenton Navarro por compartir su experiencia y conocimientos conmigo, por todos esos momentos en que siempre estuvo dispuesta a ayudarme, por la paciencia que tuvo en mi formación, pero sobre todo mi eterna gratitud por permitir que este sueño se hiciera realidad.

A mi comité tutorial: D. C. Luz Torner Aguilar, D. C. Martha Eva Viveros Sandoval y M. C. Víctor Manuel Farías Rodríguez por sus observaciones y aportaciones que enriquecieron y permitieron la realización de este proyecto.

A mi familia por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, son el pilar que me mantiene y motiva a superarme día con día.

A mis compañeros de laboratorio y amigos por todo el cariño, apoyo y paciencia que han tenido conmigo durante este tiempo, sin ustedes el estrés acumulado sería enorme.

Y finalmente pero no menos importante, a ti Mar, por caminar a mí lado en esta aventura llamada vida.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. FIEBRE.....	1
1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.2. CONCEPCIÓN HISTÓRICA.....	1
1.3. FISIOPATOLOGÍA .....	2
1.3.1. PIRÓGENOS EXÓGENOS .....	2
1.3.2. PIRÓGENOS ENDÓGENOS: CITOCINAS.....	4
1.3.2.1. INTERLEUCINA-1 (IL-1) .....	5
1.3.2.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ).....	6
1.3.2.3. INTERLEUCINA-6 (IL-6) .....	7
1.3.3. EFECTO DE LAS CITOCINAS EN LA FIEBRE.....	8
1.3.4. SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) .....	8
1.3.5. VARIACIÓN DEL PUNTO DE AJUSTE DE LA TEMPERATURA.....	9
1.3.6. REGULACIÓN DE LA FIEBRE: EJE HPA .....	10
2. TRATAMIENTO PARA LA FIEBRE .....	11
2.1. ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS (GLUCOCORTICOIDES).....	11
2.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs).....	12
2.3. EFECTOS ADVERSOS .....	13
3. FLOR DE JAMAICA ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) .....	15
3.1. DESCRIPCIÓN .....	15
3.2. CULTIVO EN MÉXICO .....	16
3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	17
3.4. USOS DE LA JAMAICA .....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPÓTESIS .....	22

IV. OBJETIVOS.....	22
1. OBJETIVO GENERAL.....	22
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	23
2. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS.....	24
3. CATETERIZACIÓN.....	25
4. INDUCCIÓN DE FIEBRE.....	25
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA.....	26
6. EVALUACIÓN DE CITOCINAS Y PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> CIRCULANTES.....	26
7. EUTANASIA.....	27
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
VI. RESULTADOS.....	28
VII. DISCUSIÓN.....	72
VIII. CONCLUSIONES.....	83
IX. PERSPECTIVAS.....	84
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	16
Tabla 2. Composición química de macronutrientes de cálices de jamaica.....	17
Tabla 3. Composición de minerales y vitaminas de cálices de jamaica. ....	18
Tabla 4. Actividad farmacológica de los extractos de jamaica.....	19
Tabla 5. Actividad hemaglutinante del extracto crudo de jamaica.....	28
Tabla 6. Actividad hemaglutinante de la fracción proteica de jamiaca .....	29
Tabla 7. Afinidad por carbohidratos de la lectina HSL .....	31
Tabla 8. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza .....	32
Tabla 9. Temperaturas del grupo Sham. ....	34
Tabla 10. Monitoreo de la temperatura del grupo Sham .....	36
Tabla 11. Monitoreo de la temperatura del grupo solución salina.....	37
Tabla 12. Monitoreo de la temperatura del grupo paracetamol.....	39
Tabla 13. Monitoreo de la temperatura del grupo nimesulida.....	40
Tabla 14. Monitoreo de la temperatura del grupo extracto crudo .....	42
Tabla 15. Monitoreo de la temperatura del grupo Lectina HSL.....	43
Tabla 16. Monitoreo de la temperatura del grupo HSL + Galactosa.....	44
Tabla 17. Monitoreo de la temperatura del grupo pigmentos .....	45
Tabla 18. ANOVA 2 vías <i>post hoc</i> Tukey para los grupos control.....	46



Tabla 19. ANOVA 2 vías <i>post hoc</i> Tukey para los grupos experimental.....	46
Tabla 20. ANOVA 2 vías <i>post hoc</i> Dunnett Grupos control vs. Grupos experimental.....	47
Tabla 21. Concentración basal y febril de IL-1 $\beta$ .....	50
Tabla 22. Concentración de IL1- $\beta$ y comparación intragrupo.....	52
Tabla 23. ANOVA de 2 vías ajuste <i>post hoc</i> de Tukey de la concentración de IL-1 $\beta$ intergrupo. ....	53
Tabla 24. Concentración basal y febril de TNF- $\alpha$ .....	55
Tabla 25. Concentración de TNF- $\alpha$ y comparación intragrupo .....	56
Tabla 26. ANOVA de 2 vías ajuste <i>post hoc</i> de Tukey de la concentración de TNF $\alpha$ intergrupo.....	58
Tabla 27. Concentración basal y febril de IL-6 .....	60
Tabla 28. Concentración de IL-6 y comparación intragrupo .....	61
Tabla 29. ANOVA de 2 vías ajuste <i>post hoc</i> de Tukey de la concentración de IL-6 intergrupo.....	63
Tabla 30. Concentración de PGE <sub>2</sub> en cada grupo.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de la fracción proteica de jamaica .....	29
Figura 2. Isoelectroenfoco de HSL .....	30
Figura 3. Incremento de la temperatura rectal inducido con levadura de cerveza.....	33
Figura 4. Temperatura basal y 18 horas después de la toma basal .....	34
Figura 5. Temperatura basal de todos los grupos.....	35
Figura 6. Temperatura a las 18 horas (febril) de todos los grupos .....	35
Figura 7. Monitoreo de la temperatura del grupo Sham .....	37
Figura 8. Monitoreo de la temperatura del grupo solución salina .....	38
Figura 9. Monitoreo de la temperatura del grupo paracetamol.....	39
Figura 10. Monitoreo de la temperatura del grupo nimesulida .....	40
Figura 11. Monitoreo de la temperatura del grupo extracto crudo .....	42
Figura 12. Monitoreo de la temperatura del grupo Lectina HSL .....	43
Figura 13. Monitoreo de la temperatura del grupo HSL + Galactosa .....	44
Figura 14. Monitoreo de la temperatura del grupo pigmentos.....	45
Figura 15. Solución salina vs. Extractos de jamaica .....	47
Figura 16. Sham vs. Extractos de Jamaica .....	48
Figura 17. Paracetamol vs. Extractos de Jamaica.....	48
Figura 18. Nimesulida vs. Extractos de Jamaica.....	49

Figura 19. Concentración basal vs febril de IL-1 $\beta$ .....	51
Figura 20. Concentración de IL-1 $\beta$ en cada grupo .....	52
Figura 21. Concentración basal vs febril de IL-1 $\beta$ .....	56
Figura 22. Concentración de TNF- $\alpha$ en cada grupo.....	57
Figura 23. Concentración basal vs febril de IL-6.....	61
Figura 24. Concentración de IL-6 en cada grupo.....	62
Figura 25. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Solución salina.....	64
Figura 26. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Paracetamol .....	65
Figura 27. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Nimesulida.....	65
Figura 28. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo Sham.....	66
Figura 29. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Extracto crudo .....	66
Figura 30. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Lectina HSL .....	67
Figura 31. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo HSL + Galactosa .....	67
Figura 32. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 en el grupo de Pigmentos.....	68
Figura 33. Concentración de PGE <sub>2</sub> en los grupos control.....	70
Figura 34. Concentración de PGE <sub>2</sub> en los grupos experimental.....	71

## ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AP-1: Activador de la proteína 1

AVP: Arginina vasopresina

BBB: Barrera hematoencefálica

BSA: Albumina sérica bovina

cAMP: Adenin monofosfato cíclico

COX: Ciclooxygenasa

COXIB: Inhibidor selectivo de COX-2

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GC: Glucocorticoide

GR: Receptor de glucocorticoides

HPA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

HSL: Lectina de *Hibiscus sabdariffa* L.

IL-1: Interleucina 1

IL-1ra: Antagonista del receptor de interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IRAK: Quinasa asociada al receptor de IL-1

JAK: Quinasa de Janus

MyD88: Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide

NF-κB: Factor nuclear kappa-B

OVLT: Órgano vascular de la lámina terminal

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGES: Sintasa de prostaglandina E

PGG<sub>2</sub>: Prostaglandina G<sub>2</sub>

PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>

RNA: Ácido ribonucleico

SNC: Sistema nervioso central

TLR: Receptor Toll-Like

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAF: Factor asociado al receptor de TNF

## RESUMEN

La fiebre es un estado de temperatura central elevada que esta mediada por citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  que pueden afectar directamente la actividad de neuronas hipotalámicas y/o estimular las síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>. Para su tratamiento se utilizan fármacos antipiréticos como los AINE que tienen la capacidad de ocasionar una serie de efectos adversos gastrointestinales, renales y cardiovasculares. La flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) posee una serie de efectos farmacológicos benéficos entre los cuales esta su efecto antipirético, además de que no provoca efectos adversos.

Este trabajo describe el efecto antipirético de extractos de *Hibiscus sabdariffa* y su efecto en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> en un modelo experimental en ratas para establecer un posible mecanismo de acción de dichos extractos. Se obtuvieron tres extractos diferentes, un extracto crudo, uno rico en pigmentos y una lectina de *Hibiscus sabdariffa* (HSL), los cuales fueron administrados a ratas con fiebre inducida por *Saccharomyces cerevisiae*, se monitoreo la temperatura por 6 horas y se obtuvieron muestras de sangre en diferentes tiempos a través de un catéter introducido previamente en la vena yugular.

Los extractos demostraron ejercer un efecto antipirético, los pigmentos a los 30 minutos, la lectina a los 60 minutos y el extracto crudo a los 90 minutos después de ser administrados con la ventaja de que no provocaron hipotermia como los controles que se emplearon (paracetamol y nimesulida) cuyo efecto antipirético fue a los 30 minutos. En cuanto a la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  los extractos de jamaica lograron inhibir su síntesis a partir de los 30 minutos, mientras que IL-6 fue inhibida por los extractos de jamaica hasta después que se daba un pico elevado entre 1 y 1.5 horas después de ser administrados. En cuanto a PGE<sub>2</sub> solo los pigmentos y el extracto crudo lograron reducir su concentración, mientras que la lectina no reducía la concentración circulante.

Por lo que proponemos que el mecanismo de acción del extracto crudo de la jamaica es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>; el mecanismo de acción de los pigmentos de la jamaica es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub>; y el mecanismo de acción de HSL es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6

**PALABRAS CLAVE:** Fiebre, antiinflamatorio no esteroideo (AINE), ciclooxigenasa (COX), prostaglandina E<sub>2</sub>, citocinas, lectina.

## ABSTRACT

Fever is a state of elevated core temperature that is mediated by cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  that can directly affect the activity of hypothalamic neurons and/or stimulate the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub>. For treatment antipyretic drugs are used such as NSAID that have the ability to cause a variety of gastrointestinal, renal and cardiovascular side effects. Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) has a number of beneficial pharmacological effects including its antipyretic effect, with the advantage that it does not cause adverse effects.

This thesis describes the antipyretic effect of extracts of *Hibiscus sabdariffa* and its effect on the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> in an experimental rat model to establish a possible mechanism of action of these extracts. Three different extracts, a aqueous extract, one rich in pigments and an *Hibiscus sabdariffa* lectin (HSL), which were administered to rats with induced fever *Saccharomyces cerevisiae*, the temperature for 6 hours was monitored and blood samples were obtained at different times through were obtained a catheter previously inserted into the jugular vein.

The extracts shown an antipyretic effect, pigments at 30 minutes, the lectin at 60 minutes and the crude extract at 90 minutes after being administered with the advantage that not cause hypothermia as the controls used (paracetamol and nimesulide at 30 minutes). The hibiscus extracts inhibit the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  from the 30 minutes to 180 minutes, while circulating IL-6 was inhibited between 1 and 1.5 hours after being administrated. The levels of PGE<sub>2</sub> were reduced with pigments and the crude extract but not with lectin.

Therefore, we propose that the mechanism of action of the crude extract of jamaica is through inhibition of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>; The mechanism of action of jamaica pigments is through inhibition of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and PGE<sub>2</sub>; and the mechanism of action of HSL is through inhibition of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6

**KEYWORDS:** Fever, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase (COX), prostaglandin E<sub>2</sub>, cytokines, lectin.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. FIEBRE**

#### **1.1. DEFINICIÓN**

La fiebre es un estado de temperatura central elevada que a menudo, pero no siempre, surge de la respuesta defensiva de los organismos multicelulares ante la invasión de materia viva o inanimada reconocida como patógeno o extraño por el hospedero (IUPS Thermal Commission, 2001).

Se caracteriza por una elevación de la temperatura central por encima del rango normal de 36.5-37.5°C debido a un aumento en el punto de ajuste regulador hipotalámico de la temperatura (Hutchison, *et al.*, 2008). Este aumento en el punto de ajuste provoca un aumento en la producción de calor y una disminución en la pérdida de calor (Anochie, 2013). Es la manifestación sistémica más común de la respuesta inflamatoria y un síntoma importante de enfermedades infecciosas (Barone, 2009); y suele ir acompañada de diversos síntomas generales, tales como sudoración, escalofríos, somnolencia, anorexia, entre otros (Anochie, 2013).

#### **1.2. CONCEPCIÓN HISTÓRICA**

Junto con el dolor, la fiebre ha constituido uno de los fenómenos más intrigantes en la lucha por la supervivencia de la especie humana, y se encuentra presente en todos los textos y tradiciones desde la más remota antigüedad (Casasbuenas, 1990). Las ideas teóricas en relación con la patogenia de la fiebre surgieron cuando médicos hipocráticos propusieron que la temperatura corporal y la armonía fisiológica en general comprendían un delicado equilibrio entre los cuatro humores corporales: sangre, flema, bilis negra y bilis amarilla (Atkins, 1982). Se consideraba que la fiebre era resultado de un exceso de bilis amarilla, en respuesta a este desbalance, el cuerpo desarrollaba una fiebre que cocinaba el exceso del humor y finalmente se alejaba del cuerpo (Alpizar & Medina, 1999).



Durante la Edad Media la posesión demoniaca se agregó a la lista de los mecanismos que se consideraban responsables de la fiebre. Posteriormente alrededor del siglo XVIII, el descubrimiento de Harvey de la circulación de la sangre y el nacimiento de la química clínica condujo a emitir hipótesis alternativas acerca de que el calor del cuerpo y la fiebre eran resultado de la fricción asociada con el flujo sanguíneo a través del sistema vascular, y de la fermentación y putrefacción que se produce en la sangre y en los intestinos. En el siglo XIX como resultado del trabajo de Claude Bernard, los procesos metabólicos que se producen dentro del organismo llegaron a reconocerse como la fuente de calor del cuerpo (Atkins, 1982; Mackowiak, 1998). Estudios realizados en el siglo pasado, y especialmente en las últimas décadas, han contribuido en gran medida a la comprensión de este complejo proceso y los mecanismos responsables de su inducción (Netea, *et al.*, 2000).

### **1.3. FISIOPATOLOGÍA**

Actualmente se tiene una concepción más clara de este fenómeno, se sabe que la fiebre esta mediada por pirógenos (exógenos y endógenos) que promueven la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>, molécula responsable de elevar de forma regulada el punto de ajuste de la temperatura localizado en el área preóptica del hipotálamo. Esto desencadena un conjunto de respuestas que conllevan a una mayor producción de calor y una menor perdida de este (Kushimoto, *et al.*, 2014; Sullivan & Farrar, 2011).

#### **1.3.1. PIRÓGENOS EXÓGENOS**

Los pirógenos son moléculas capaces de producir fiebre y han sido tradicionalmente divididos en dos categorías generales: los que se originan fuera del cuerpo (pirógenos exógenos) y los que provienen de las células del hospedero (pirógenos endógenos) (Mackowiak, 1998).

Los pirógenos exógenos provienen principalmente de microorganismos, como el lipopolisacárido presente en la membrana de bacterias Gram-negativas (Harden, *et al.*, 2013); el peptidoglicano, lipoproteínas y ácido lipoteicoico de la membrana de bacterias Gram-positivas (Hasiwa, *et al.*, 2013); componentes fúngicos como glucanos y mananos (Cross & Bancroft, 1995); y componentes virales (Jakeman, *et al.*, 1991).

Estos pirógenos pueden accionar mecanismos de defensa innatos realizados por macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrófilos del hospedero, interactuando con receptores presentes en estas células (Hasiwa, *et al.*, 2013). De estos receptores los más estudiados son los de la familia Toll-like (TLRs); el TLR1 reconoce lipoproteínas triacetiladas; TLR2 es esencial para el reconocimiento de peptidoglicano; TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA de doble cadena, el cual es generado en el ciclo de vida de los virus; TLR4 es un receptor para lipopolisacárido; TLR5 reconoce flagelina, un componente de los flagelos bacterianos; TLR6 se requiere para el reconocimiento de lipoproteínas diacetiladas; TLR7 es crucial para el reconocimiento de imidazoquinolina (imiquimod), un compuesto sintético antiviral; y TLR9 es un receptor para el DNA bacteriano (Chow, *et al.*, 1999; Takeda, *et al.*, 2003; Yamamoto, *et al.*, 2003). Otros receptores que han sido bien caracterizados son dectin-1 y dectin-2, que juegan un papel importante en la respuesta antifúngica del hospedero. Dectin-1 es el receptor especializado de  $\beta$ -glucanos, un componente principal de la pared celular de los hongos, mientras que dectin-2 se une a carbohidratos de tipo manosa y  $\alpha$ -mananos (Hasiwa, *et al.*, 2013). Las vías de señalización de estos receptores conducen finalmente a la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la posterior secreción de citocinas pro-inflamatorias (Ghosh, *et al.*, 2010; Hasiwa, *et al.*, 2013; Takeda, *et al.*, 2003).

### 1.3.2. PIRÓGENOS ENDÓGENOS: CITOCINAS

Los pirógenos endógenos son moléculas secretadas por células del hospedero y entre ellas se encuentran las citocinas, grupo de proteínas o glicoproteínas con un peso molecular que varía de 8 a 40 kDa. Casi todas las células nucleadas son capaces de sintetizar estas proteínas y, a su vez, responder a ellas. Se han identificado más de 200 y han sido divididas en varios subgrupos: interleucinas, factores de crecimiento, quimiocinas, interferones, hematopoyetinas y factores estimulantes de colonias (Banerjee & Saxena, 2012).

Son sintetizadas principalmente por monocitos y macrófagos (Martins, *et al.*, 2010), y su función es la regulación y coordinación de la respuesta inmune. En el sistema nervioso central, se cree que pueden afectar directamente a la función neuronal y que también participan en procesos inflamatorios locales (Conti, *et al.*, 2004). Varias citocinas, incluyendo IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , demostraron tener efectos piréticos (Leon, 2002).

Están entre las proteínas más altamente inducibles. Su nivel de expresión puede ir de  $10^{-15}$  -  $10^{-12}$  M, niveles apenas detectables, a  $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  M en cuestión de 30-90 minutos en respuesta a estímulos bacterianos, fúngicos, víricos, inflamatorios o de estrés (Conti, *et al.*, 2004).

La expresión de estas citocinas está regulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. En la mayoría de las células, las proteínas NF- $\kappa$ B (p50 NF- $\kappa$ B1, p65/Rel A, c-Rel, NF- $\kappa$ B2/p52, y Rel B) son retenidas en el citoplasma mediante su asociación con la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Después de una estimulación extracelular, I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilado a través de una cascada de proteínas quinasas inducibles, ubiquitinado, y degradado selectivamente en el citoplasma por el proteasoma 26S. Esto resulta en el desenmascaramiento de la secuencia de localización nuclear de los heterodímeros NF- $\kappa$ B p50/65, que se translocan al núcleo y estimulan la transcripción de los genes sensibles a NF- $\kappa$ B, como las citocinas proinflamatorias (Ghosh, *et al.*, 2010).

Las citocinas pueden regular la producción de cada una de las demás. Por ejemplo, IL-1 $\beta$  es uno de los inductores más potentes de TNF- $\alpha$ , y éste es un potente estimulador de la producción de IL-1 $\beta$ ; finalmente tanto IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  inducen IL-6 (Zetterstrom, *et al.*, 1998; Zhang, *et al.*, 1990)

### **1.3.2.1. INTERLEUCINA-1 (IL-1)**

La familia IL-1 son citocinas que juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria, como pirógenos endógenos, como mediadores en la activación de la inmunidad innata, el estrés y en la patogénesis de varias enfermedades crónicas (Banerjee & Saxena, 2012; Boraschi, *et al.*, 2011; Moltó & Olivé, 2010).

Está formada por un total de 11 miembros (Boraschi, *et al.*, 2011) siendo los más estudiados, interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y el antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) (Gabay, *et al.*, 2010). En los seres humanos, los genes que codifican para estas proteínas se encuentran en un clúster en el cromosoma 2 (2q14) (Conti, *et al.*, 2004).

La isoforma IL-1 $\beta$  es un potente pirógeno endógeno (Conti, *et al.*, 2004), se sintetiza principalmente como una proteína inmadura de 31 kDa denominada Pro-IL-1 $\beta$  esta proteína sigue siendo citosólica hasta que se convierten en una proteína madura de 17.5 kDa por escisión proteolítica de la enzima convertidora (ICE)/caspasa-1 (CASP1) de interleucina-1 (Banerjee & Saxena, 2012).

Las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra se unen a los mismos receptores: receptores de IL-1 tipo I y tipo II, miembros de la familia de receptores Toll-like. El receptor tipo I de IL-1 se compone de una proteína de unión (IL-1RI) y una proteína accesoria (IL-1RAcP) responsable de la transducción de señales. La unión de IL-1 a IL-1RI conduce a los cambios estructurales que permiten el acoplamiento de la IL-1RAcP, un evento necesario para el reclutamiento/activación de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), la quinasa asociada al

receptor IL-1 (IRAK) y el factor asociado al receptor de TNF (TRAF), vía de señalización que en última instancia conduce a la activación del factor NF- $\kappa$ B. Un segundo tipo de receptor IL-1 (IL-1RII), actúa como una molécula "señuelo" de unión a IL-1 $\beta$  con alta afinidad, sin embargo, no se activa la cascada de señalización (Conti, *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2010).

La IL-1 $\beta$  puede regular la respuesta de fiebre a través de la modulación transcripcional de la producción de otros pirógenos (TNF- $\alpha$  e IL-6) y antipiréticos (IL-1ra e IL-10) a partir de macrófagos, células endoteliales y microglía (Conti, *et al.*, 2004; Souza, *et al.*, 2003).

### **1.3.2.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria pleiotrópica, cuya función está implicada en una amplia gama de condiciones inflamatorias, infecciosas y autoinmunes (Apostolaki, *et al.*, 2010).

El locus del gen de TNF- $\alpha$  se encuentra en el cromosoma 6 (6p21.31) que abarca alrededor de 3 kb de DNA y contiene 4 exones. Existe en solución como un homotrímero de masa molecular total de 52 kDa y esta es la forma que se une a sus receptores (Idriss & Naismith, 2000; Laddha, *et al.*, 2012).

Actúa a través de dos receptores transmembranales: el receptor 1 de TNF (TNFR1), también conocido como p55, y el receptor 2 de TNF (TNFR2), también conocido como p75. TNFR1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de mamíferos, mientras que la expresión de TNFR2 está altamente regulada y se expresa típicamente en las células del sistema inmune (Parameswaran & Patial, 2010).

Para la transducción de señales por estos receptores son necesarias unas proteínas citoplasmáticas denominadas factores asociados al receptor del TNF (TRAF). Estas proteínas forman complejos multimoleculares e interaccionan con

las regiones citoplasmáticas de los receptores, produciéndose en último término la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. También es necesaria la oligomerización de varias cadenas del receptor para que tenga lugar la señalización al interior de la célula (Idriss & Naismith, 2000; Parameswaran & Patial, 2010).

### **1.3.2.3. INTERLEUCINA-6 (IL-6)**

La IL-6 es una glicoproteína secretada de 26 kDa que contiene 212 aminoácidos dispuestos en cuatro cadenas alfa. En los seres humanos, el gen de la IL-6 está codificado en el cromosoma 7 (7p21). Puede ser producido por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células T y B, macrófagos, monocitos activados, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células gliales, fibroblastos, condrocitos, adipocitos, osteoblastos y células endoteliales (Assier, *et al.*, 2010).

Puede facilitar fenómenos autoinmunes, amplificar la inflamación aguda y promover la evolución a un estado inflamatorio crónico (Fonseca, *et al.*, 2009). Además de participar como un importante mediador de la fiebre, en particular, la última fase de la respuesta febril (Harden, *et al.*, 2011).

Ejerce sus actividades biológicas a través de dos moléculas, un receptor específico para IL-6 (IL-6R) y un transductor de señales (gp130). Cuando la IL-6 se une al receptor de membrana, la homodimerización de gp130 es inducida, y se forma un complejo receptor funcional de alta afinidad: IL-6/IL-6R/gp130 (Hashizume & Mihara, 2011).

La homodimerización del complejo receptor conduce a la activación de quinasas de Janus (JAK) y la posterior fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplásmico de la gp130 (Scheller, *et al.*, 2011). Esto activa dos vías principales de señalización: la vía JAK/STAT y la vía Ras/Raf/MAPK. Estas dos señales de forma independiente inducen una variedad de actividades biológicas al activar diferentes genes específicos (Mihara, *et al.*, 2012).

### **1.3.3. EFECTO DE LAS CITOCINAS EN LA FIEBRE**

La elevación de la temperatura que se produce durante la fiebre está regulada por neuronas de la región preóptica del hipotálamo. IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  pueden afectar directamente la actividad de las neuronas hipotalámicas y/o estimular la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>, principal molécula responsable de afectar la actividad de dichas neuronas. Estas citocinas se pueden producir en la periferia, así como en el SNC. (Conti, *et al.*, 2004).

Existen varias teorías de cómo las citocinas periféricas pueden afectar los mecanismos centrales de la fiebre: 1) Transporte saturable endotelial a través de la barrera hematoencefálica (BBB) para IL-1; 2) entrada a través de áreas carentes de BBB, como en los órganos circunventriculares, sobre todo el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) en la línea media del área preóptica del hipotálamo; 3) a través de receptores para IL-1 y PGE<sub>2</sub> en fibras neuronales aferentes del nervio vago; 4) síntesis de PGE<sub>2</sub> en la BBB; y 5) síntesis de citocinas en células endoteliales de SNC (Blatteis, 2007; Conti, *et al.*, 2004; Romanovsky, *et al.*, 2005; Roth & Souza, 2001).

### **1.3.4. SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

Las prostaglandinas son un grupo de ácidos grasos de 20 carbonos producidos a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa en respuesta a estímulos inflamatorios (Chung-Davidson, *et al.*, 2013). La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) se ha asociado con la inflamación, el dolor y la fiebre (Buvanendran, *et al.*, 2006).

La cascada de síntesis de PGE<sub>2</sub> consta de tres reacciones catalizadas por tres tipos de enzimas, fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), ciclooxigenasa (COX) y sintasa de PGE (PGES). Estas tres reacciones son: 1) la liberación del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana, catalizado por la fosfolipasa A<sub>2</sub>; 2) acción de la ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico, primero se encarga de su ciclación y

oxigenación, formando la PGG<sub>2</sub>, y después reduce la PGG<sub>2</sub> originando la PGH<sub>2</sub>; 3) las PGES convierten la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub> (Abdul-Malik, *et al.*, 2013; Chung-Davidson, *et al.*, 2013; Esplugues & López-Jaramillo, 1997).

Particularmente son las isoformas sPLA<sub>2</sub>, COX-2 y mPGES-1, las que son estimuladas por IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6, (Romanovsky, *et al.*, 2005). Se ha encontrado la sobreexpresión de estas enzimas durante la fiebre en órganos periféricos como hígado y pulmón (Romanovsky, *et al.*, 2006), así como en el hipotálamo en SNC (Romanovsky, *et al.*, 2005).

La PGE<sub>2</sub> se une a receptores acoplados a proteína G, que incluyen cuatro subtipos, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>, cada uno con diferentes vías de transducción de señales y funciones (Salleh, 2014). El receptor EP<sub>3</sub> es el receptor de PGE<sub>2</sub> más abundante en el área preóptica del hipotálamo (Romanovsky, *et al.*, 2005) y es requerido para la respuesta febril (Lazarus, *et al.*, 2007). La principal vía de señalización para EP<sub>3</sub> implica la proteína inhibitoria G<sub>i</sub>, que inhibe la actividad de la adenil ciclasa (AC), disminuyendo así los niveles de cAMP y el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Tran, *et al.*, 2013).

### **1.3.5. VARIACIÓN DEL PUNTO DE AJUSTE DE LA TEMPERATURA**

El "punto de ajuste" del sistema termorregulador se puede definir como la temperatura corporal media en la que ni se activan mecanismos de pérdida de calor, ni respuestas efectoras que producen calor (Conti, *et al.*, 2004).

El control de la temperatura corporal está mediado principalmente por las neuronas de la zona anterior del hipotálamo que pueden detectar cambios en la temperatura central y superficial del cuerpo (Conti, *et al.*, 2004). Todas las neuronas sensibles a la temperatura del hipotálamo se puede dividir en dos grandes clases: sensibles al calor (más abundantes) y sensibles al frío (Romanovsky, *et al.*, 2005).



La interacción entre PGE<sub>2</sub> y su receptor EP<sub>3</sub> provoca una reducción en la actividad de las neuronas sensibles al calor y por lo tanto un aumento de la actividad de las neuronas sensibles al frío (Blatteis, 2007; Boulant, 2000). Esto incrementa las respuestas de producción y retención de calor, y se produce la fiebre. Dichas respuestas son activadas por el sistema nervioso autónomo, tales como la vasoconstricción, reducción de la sudoración, erección del pelo y escalofríos que promueven la conservación de calor, mientras que, la liberación de hormonas como la epinefrina y la tiroxina aumentan la tasa metabólica, y por lo tanto la producción de calor (Anochie, 2013). Cuando los niveles de pirógenos disminuyen, las tasas de disparo de las neuronas sensibles a la temperatura vuelven a sus niveles normales, activando respuestas para la pérdida de calor y la reducción de la producción de calor (Boulant, 2000; Romanovsky, 2006).

### **1.3.6. REGULACIÓN DE LA FIEBRE: EJE HPA**

La fiebre puede ser regulada de forma endógena por la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), el cual inhibe la respuesta febril (Romanovsky, et al., 2005). Puede ser activado por diferentes señales, entre las que se encuentran las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y principalmente IL-6 (Chrousos, 1995; Torpy, *et al.*, 2000).

La activación del eje comienza con la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP), que se liberan en el sistema porta hipofisario, promoviendo la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) de la hipófisis anterior. La ACTH se libera en la circulación periférica y conduce a la secreción de glucocorticoides en la corteza de las glándulas suprarrenales (Choi, *et al.*, 2007; Papadimitriou & Priftis, 2009; Tsigos & Chrousos, 2002).

Los glucocorticoides son los efectores finales del eje HPA y participan en el control de la homeostasis del cuerpo (Tsigos & Chrousos, 2002), principalmente el cortisol en humanos y la corticoesterona en roedores (Smith & Vale, 2006). Sus efectos

fisiológicos están mediados por una proteína citosólica de 94 kDa, el receptor de glucocorticoides (GR), que se encuentra ampliamente distribuido en células del cerebro y de tejidos periféricos. Dentro de estos efectos está el de inhibir la producción de las citocinas IL-1, TNF e IL-6, y por lo tanto sus efectos piréticos (Chrousos, 1995; Smith & Vale, 2006). Los glucocorticoides circulantes ejercen una retroalimentación negativa, tanto en el hipotálamo y la hipófisis, frenando la secreción de CRH y ACTH respectivamente (Papadimitriou & Priftis, 2009).

## **2. TRATAMIENTO PARA LA FIEBRE**

Durante la fiebre se ve alterada la actividad, sueño y comportamiento del que la padece, además de una disminución de la ingesta oral, es por ello que el uso de antipiréticos se emplea con la creencia de que la mayor parte de los beneficios son la mejora del bienestar, menos irritabilidad y un sentido más fiable del estado clínico general del paciente. Sin embargo se ha identificado que las fiebres altas, si no se tratan, se asocian con convulsiones, daño cerebral y en casos extremos la muerte (Sullivan & Farrar, 2011).

El uso de antipiréticos es muy común en la práctica clínica, los fármacos conocidos como antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos son los más recetados en todo el mundo a pesar de los efectos adversos que ocasionan (Couto de Lima, *et al.*, 2012; Purssell, 2011).

### **2.1. ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS (GLUCOCORTICOIDES)**

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroideas derivadas del metabolismo del colesterol. Existen GC naturales y sintéticos, el cortisol es un GC natural producido en la glándula adrenal después de la estimulación del eje HPA, y la prednisona, dexametasona y betametasona son GC sintéticos que han sido una

de las clases más comúnmente prescritas de medicamentos para enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Couto de Lima, *et al.*, 2012).

La mayoría de los efectos de los GC están mediados por el receptor de glucocorticoides (GR), un factor de transcripción citosólico que regula la expresión de genes. GR puede regular la expresión génica, ya sea mediante la unión a promotores de genes diana o mediante la interacción con otros factores de transcripción, tales como el factor NF- $\kappa$ B o el activador de la proteína-1 (AP-1), perjudicando su capacidad para activar la expresión de genes específicos que codifican algunas citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, etc. (Ayroldi, *et al.*, 2012).

## **2.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE)**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son uno de los grupos de drogas más utilizados en todo el mundo. Son un grupo diverso de compuestos que poseen propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias (Harirforoosh, *et al.*, 2013).

Se pueden clasificar de diferentes formas, de acuerdo a la estructura química en: salicilatos, derivados del ácido propiónico, ácidos piranocarboxílicos, ácido acético heteroarilo, alcanonas, indolacético, ácido acético indene, oxicams, pirrol o-pirrol, fenamatos, diaril heterocíclico; o también se puede clasificar de acuerdo a su capacidad de inhibir la enzima ciclooxigenasa en: Inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIBs) y AINE no selectivos (Harirforoosh, *et al.*, 2013).

Dentro de los AINE no selectivos se encuentran fármacos como el ketorolaco, flurbiprofeno, ketoprofeno, indometacina, ácido acetilsalicílico, naproxeno, ibuprofeno, entre otros; mientras que dentro de los COXIBs se encuentran el rofecoxib, etodolaco, meloxicam, celecoxib, diclofenaco, sulindaco, piroxicam, nimesulida, entre otros (Harirforoosh, *et al.*, 2013). Aunque el paracetamol se

utiliza para tratar el dolor inflamatorio, no se clasifica generalmente como un AINE, ya que presenta una débil actividad antiinflamatoria (Asif, 2014). Normalmente se utiliza para tratar fiebres o dolor, en especial se recomienda para las personas que no pueden tomar AINE debido a la alergia o sensibilidad estomacal que producen (Malhotra, *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción de los AINE consiste en inhibir a las ciclooxigenasas (COX), enzimas que participan en una compleja cascada biosintética cuya función principal es catalizar la transformación de ácido araquidónico en el intermediario  $PGH_2$ , precursor de la prostaglandina  $E_2$  (Asif, 2014).

Hay dos formas principales de la COX (COX-1 y COX-2). La COX-1 está codificada en el cromosoma 9 (9q32-9q33.3), contiene 11 exones y se extiende a través de 40 kb, está constantemente activa y está presente en la mayoría de las células del cuerpo; mientras que la COX-2 se encuentra codificada en el cromosoma 1 (1q25.2-25.3), contiene 10 exones y abarca 7.5 kb, es inducida por citocinas en células inflamatorias, sin embargo, puede expresarse de forma constitutiva en el riñón y el sistema nervioso central (Abdul-Malik, *et al.*, 2013; Gadek-Michalska, *et al.*, 2013; Zafar & Kehar, 2013). Existe evidencia de una tercer isoforma (COX-3), una variante de la COX-1, que podría ser el blanco terapéutico del paracetamol (Shivaprakash, *et al.*, 2013).

### **2.3. EFECTOS ADVERSOS**

Los efectos adversos de los glucocorticoides observados durante terapias a corto plazo incluyen aumento del apetito, aumento de peso, retención de líquidos, gastritis, dolor de cabeza, cambios de humor, aumento de azúcar en la sangre, hipertensión y glaucoma. Durante terapias a largo plazo incluyen inmunidad suprimida, aumento de la susceptibilidad a las infecciones, aumento de los niveles de colesterol, aumento de peso, osteoporosis, deposición de grasa corporal,

adelgazamiento de la piel, cataratas, retraso del crecimiento y supresión del eje HPA (Couto de Lima, *et al.*, 2012).

Por otro lado los AINE tienen una serie de efectos adversos que afectan principalmente a los sistemas gastrointestinal, renal y cardiovascular. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que toman dosis terapéuticas y de duración corta por lo general las toleran bien. Sin embargo, con un tratamiento más prolongado y en presencia de comorbilidades puede surgir un riesgo más alto (Harirforoosh, *et al.*, 2013). El principal efecto secundario es la hemorragia gastrointestinal inducida por la inhibición de la ciclooxigenasa lo que produce pérdida de los efectos cito-protectores que normalmente ejerce la PGE<sub>2</sub> en la mucosa gastroduodenal, como: producción de moco epitelial, secreción de bicarbonato, flujo sanguíneo en la mucosa y proliferación de las células epiteliales. La PGE<sub>2</sub> es un vasodilatador que juega un papel fundamental en la excreción de sal y agua en el riñón y cualquier cambio en la función renal puede influir en el sistema cardiovascular (Harirforoosh, *et al.*, 2013; Kracer & Alduncin, 2005; Launey, *et al.*, 2011).

El paracetamol generalmente es seguro a dosis terapéuticas menores a 4 g/día (Niven & Laupland, 2013), la sobredosis aguda de paracetamol puede causar daño potencialmente mortal al hígado y, en casos raros, una dosis normal puede hacer lo mismo. La toxicidad del paracetamol es la causa más importante de insuficiencia hepática aguda (Asif, 2014; Launey, *et al.*, 2011; Sullivan & Farrar, 2011). También se ha observado que puede inducir hipotermia debido a una reducción de PGE<sub>2</sub> en el cerebro (Asif, 2014).

Se sabe que entre un 10 y 20% de los pacientes que toman AINE presentan gastritis y se estima que los efectos adversos causados por la administración de AINE conllevan a más de 100 mil hospitalizaciones y unos 16 mil muertes cada año en los Estados Unidos (Green, 2001). Los efectos adversos son debidos en gran parte a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-1 constitutiva y son frecuentes sobre todo en ancianos. Entre estas reacciones adversas destacan:

gastritis, ulcera péptica, sangrado gastrointestinal, hipertensión, alteración en SNC como: cefalea, mareo, insomnio, depresión y confusión; Reacciones hematológicas como hemorragias producidas por la actividad antiagregante plaquetaria y Reacciones alérgicas como urticaria, edema angioneurótico y Síndrome de Steven Johnson, sinagesia o parestesia (entumecimiento y hormigueo), hipotensión, shock, síncope, Síndrome de Reye entre otros (Jordan & White, 2001; Valsecia, *et al.*, 2005, 2007; Wolfe, *et al.*, 1999 ).

En general, el tratamiento con antiinflamatorios es complejo, ya que implica una decisión basada en el riesgo-beneficio que implica su uso de acuerdo a la condición del paciente (Harirforoosh, *et al.*, 2013).

### **3. FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

#### **3.1. DESCRIPCIÓN**

*Hibiscus sabdariffa* L. conocida popularmente en México como “Jamaica” o “flor de jamaica”, es un arbusto erecto anual que pertenece a la familia Malvaceae (en la tabla 1 se presenta su clasificación taxonómica). Puede crecer de 0.5 a 3 metros de altura, presenta tallos cilíndricos, lisos, de color verde o rojo; su cáliz es en forma de copa y contiene las bases de sus cinco pétalos, es de color rojo y su tamaño oscila entre 1.5 a 3.5 cm de diámetro. La planta tarda de unos 3 a 4 meses para llegar a la etapa de madurez y su cultivo es adecuado para climas tropicales con precipitaciones de 1500-2000 mm/año, desde el nivel del mar hasta los 600 m de altitud. Su origen es incierto, aunque se cree que es originaria de la India, se puede encontrar actualmente en casi todos los países cálidos, como la India, Arabia Saudita, Malasia, Indonesia, Tailandia, Filipinas, Vietnam, Sudán, Egipto y México. (Babalola, *et al.*, 2001; Chen, *et al.*, 2005; Ismail, *et al.*, 2008; Udayasekhara, 1996).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Hibiscus</i>
Especie	<i>Sabdariffa</i> L.

Fuente: (Ortiz-Márquez, 2008).

### 3.2. CULTIVO EN MÉXICO

La flor de jamaica en México se agrupa en el sector de especias y plantas medicinales, siendo un cultivo no tradicional que se desarrolla en regiones donde predomina un clima cálido. La producción a nivel mundial la encabeza China con 27.76% de su producción, seguido por la India (17.91%), Sudán (9.1%), Uganda (8.4%), Indonesia (6.23%), Malasia (5.53%) y en séptimo lugar México con el 5.14% (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2012).

En México, la producción nacional en los últimos 5 años ha sido en promedio de 5300 ± 287 toneladas. La principal producción de jamaica se concentra en los estados de Guerrero con 77.52%, Oaxaca con 12.61%, Michoacán con 3.60%, Nayarit con 2.68%, Puebla con 1.89% y el 1.7% restante se produce en los estados de Campeche, Colima, Jalisco y Veracruz (Cid-Ortega & Guerrero-Beltrán, 2012).

### 3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición en los cálices de jamaica varía, principalmente, de acuerdo a la variedad, color y diferencias genéticas. Es una importante fuente de vitaminas, minerales, y compuestos bioactivos (Al-Hashimi, 2012).

En la Tabla 2 se presenta la composición química de macronutrientes de los cálices de jamaica, se puede apreciar un contenido importante de proteína y fibra cruda.

**Tabla 2.** Composición química de macronutrientes de cálices de jamaica.

Componente	Duke y Atchley (1984)	Ortiz-Márquez (2008)	Mahadevan y col. (2009)
Agua	86.2	87.92	86.2
Proteína	1.6	1.04	1.7
Grasa	0.1	0.14	1.1
Carbohidratos totales	11.1	10.1	-
Fibra	2.5	3.89	10
Ceniza	1	0.8	1

Los valores están expresados en mg/100 g de cálices.

Fuente: (Duke & Atchley, 1984; Mahadevan, et al., 2009; Ortiz-Márquez, 2008).

Así mismo la jamaica es una fuente importante de calcio, magnesio y vitaminas (Tabla 3) componentes indispensables para llevar acabo funciones vitales para el hombre.



**Tabla 3.** Composición de minerales y vitaminas de cálices de jamaica.

Componente	Duke y Atchley (1984)	Ortiz-Marquez (2008)	Mahadevan y col. (2009)
Calcio	16	14.74	12.63
Fosforo	60	-	273.2
Hierro	3.8	27.14	8.98
Magnesio	-	531.99	-
Zinc		14.32	-
$\beta$ -caroteno	0.285	-	0.029
Tiamina	0.04	-	0.117
Riboflavina	0.6	-	0.277
Niacina	0.5	-	3.765
Ácido ascórbico	14	-	6.7

Los valores están expresados en mg/100 g de cálices

Fuente: (Duke & Atchley, 1984; Mahadevan, *et al.*, 2009; Ortiz-Márquez, 2008)

Respecto al contenido de compuestos bioactivos cuenta principalmente con fenoles mayoritariamente las antocianinas, aunque también contiene saponinas, flavonoides (hibiscetina, hibiscitrina, sabdaretina), taninos, glucósidos cianogénicos, poliurónidos, gomas, mucilagos, ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido hibisco), triterpenoides y alcaloides (Mahadevan, *et al.*, 2009; Mungole & Chaturvedi, 2011; Yagoub, *et al.*, 2008).

El contenido total de antocianinas oscila entre 128-145 mg/L de extracto acuoso de los cálices, y las principales antocianinas presentes son la delfinidina-3-sambubiosido (71.4%) y la cianidina-3-sambubiosido (26.6%) (Ojeda, *et al.*, 2010; Ramírez-Rodríguez, *et al.*, 2011; Segura-Carretero, *et al.*, 2008).

### 3.4. USOS DE LA JAMAICA

Los diversos usos que se le han dado a la jamaica incluyen sus usos en la producción de alimentos y la medicina tradicional. Su uso alimenticio incluye la elaboración de bebidas locales sin alcohol, vino industrial, mermeladas, té, jaleas, entre otros (Bolade, *et al.*, 2009).

En cuanto a sus propiedades medicinales, en las últimas décadas se han desarrollado investigaciones para comprobar lo que por creencia popular se le atribuye a esta planta, en la tabla 4 se muestran sus diversas acciones farmacológicas.

De igual manera se ha evaluado la toxicidad de los extractos de esta planta, Onyenekwe y col. (1999) encontraron que la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de los extractos de jamaica administrados en ratas está por encima de 5000 mg/kg lo que indica que el extracto no es tóxico. Es por ello que en vista de su nula toxicidad, aunado a sus propiedades nutricionales y farmacológicas, podría ser una fuente de productos terapéuticamente útiles (Ali, *et al.*, 2005; Qi, *et al.*, 2005).

**Tabla 4.** Actividad farmacológica de los extractos de jamaica.

Actividad farmacológica		Modelo de investigación	Tipo de extracto	Referencia
Hipolipidémico	Colesterol	Rata	Acuoso	(Agoreyo, <i>et al.</i> , 2008)
		Humano	Acuoso (capsulas)	(Tzu-Li, <i>et al.</i> , 2007)
		Humano	Acuoso	(Mozaffari-Khosravi, <i>et al.</i> , 2009)
	Triglicéridos	Rata	Alcohólico	(Gosain, <i>et al.</i> , 2010)
		Humano	Acuoso	(Mozaffari-Khosravi, <i>et al.</i> , 2009)
	Lipoproteínas de baja densidad	Rata	Alcohólico	(Gosain, <i>et al.</i> , 2010)
		Humano	Acuso	(Mozaffari-Khosravi, <i>et al.</i> ,

				2009)
Hipoglucémico	Rata	Acuoso	(Agoreyo, <i>et al.</i> , 2008)	
Diurético	Rata	Acuoso	(Alarcón-Alonso, <i>et al.</i> , 2011)	
	Rata	Acuoso	(Marquez-Vizcaino, <i>et al.</i> , 2007)	
Natriurético	Rata	Acuoso	(Alarcón-Alonso, <i>et al.</i> , 2011)	
Antioxidante	<i>In vitro</i>	Alcohólico y acuoso	(Al-Hashimi, 2012)	
	Rata	Alcohólico	(Essa & Subramanian, 2006)	
	Rata	Alcohólico	(Usoh, <i>et al.</i> , 2005)	
Antibacteriano	<i>In vitro</i>	Alcohólico y acuoso	(Al-Hashimi, 2012)	
Efectos protectores contra la toxicidad reproductiva (daño testicular y calidad de los espermatozoides) causada por cisplatino	Rata	Acuoso	(Amin & Hamza, 2006)	
Antihiperamonémico (disminución de niveles elevados de amoniaco en sangre)	Rata	Alcohólico	(Essa & Subramanian, 2006)	
Antihipertensivo	Humano	Acuoso	(Haji-Faraji & Haji-Tarkhani, 1999)	
	Humano	Acuoso	(Mozaffari-Khosravi, <i>et al.</i> , 2009)	
	Humano	Acuoso	(McKay, <i>et al.</i> , 2010)	
Antipirético	Rata	Alcohólico	(Reanmongkol & Itharat, 2007)	
	Rata	Acuoso	(Velázquez & Fenton, 2010)	

## 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. Puede producir delirios, daño neurológico, e incluso inducir convulsiones en personas con predisposición genética.

Para su tratamiento se utilizan fármacos antipiréticos que generan efectos adversos como lesiones gastrointestinales, alteración del sistema nervioso central, alteración de la función renal, reacciones alérgicas, reacciones hematológicas, entre otros. Se sabe que entre un 10 y 20% de los pacientes que toman AINE presentan gastritis y se estima que los efectos adversos causados por la administración de AINE conllevan a más de 100 mil hospitalizaciones y unas 16 mil muertes cada año en los Estados Unidos. Es por ello que se buscan alternativas al tratamiento de la pirexia.

Los extractos de la flor de jamaica tienen actividad antipirética y no presentan toxicidad en altas dosis, por lo que es una opción eficaz y sin efectos adversos para el remedio de la fiebre.

Los mecanismos de antipiréticos reportados involucran rutas que modifican las concentraciones circulantes de citocinas y/o prostaglandina E<sub>2</sub>. Por estudios previos del grupo de trabajo se sabe de la actividad antipirética de los extractos de la flor de jamaica, pero se desconoce el mecanismo de regulación de dichos extractos.

### **III. HIPÓTESIS**

El mecanismo antipirético de los extractos acuosos y proteicos de la jamaica es a través de la regulación de niveles circulantes de citocinas y prostaglandina E<sub>2</sub>.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **1. OBJETIVO GENERAL**

Elucidar el mecanismo antipirético de los extractos acuosos y proteicos de la jamaica.

#### **2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener extractos acuosos y proteicos de la jamaica.
- Comprobar el efecto antipirético de la jamaica (extractos crudo, proteicos y pigmentos) en un modelo animal.
- Cuantificar los niveles circulantes de citocinas pro inflamatorias (diferentes tiempos).
- Cuantificar los niveles circulantes de prostaglandina E<sub>2</sub> (diferentes tiempos).
- Establecer el mecanismo de acción antipirética de los extractos.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS**

#### **Extracto crudo**

Se homogenizaron 500 g de flores de jamaica secas con 1000 ml de agua destilada, se filtró la mezcla, el filtrado se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos y al sobrenadante se le denominó extracto crudo.

#### **Pigmentos**

Se removieron los pigmentos a 1000 g de flores de jamaica secas por medio de extracciones con agua, se hicieron un total de doce lavados (2500 ml cada lavado) y se eliminó el agua mediante una evaporación simple para reducir el volumen y concentrar los pigmentos.

#### **Fracción proteica**

Se utilizaron las flores de jamaica que previamente se le habían removido los pigmentos (1000 g), estas se homogenizaron con agua (2000 ml), se filtró la mezcla, el filtrado se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos, se separó el sobrenadante y este se liofilizó. Posteriormente se hidrató la muestra liofilizada con agua destilada para realizar una precipitación fraccionada 60-80% de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos, el precipitado se dializó con membranas Spectra-Por MWCO: 3500 (Spectrum Laboratories, Inc.) en agua destilada. A la fracción dializada se le denominó fracción proteica.

## **2. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS**

### **Cuantificación de proteínas**

Se utilizó el método de Bradford (1976), el cual se basa en la unión del colorante Coomassie G-250 azul a la proteína presente en la muestra, la cuantificación de proteínas se obtiene al leer la absorbancia a 595 nm e interpolarla en una curva patrón de albumina de suero de bovino (BSA)

### **Ensayos de hemaglutinación**

Se realizó para detectar la presencia de lectinas utilizando un panel de fenotipo conocido para los cuatro grupos sanguíneos humanos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O). Se desarrolló en placas de 96 pozos (Corning Incorporated) utilizando el método de dilución serial. Los resultados se expresan como unidades de hemaglutinación, actividad específica (mg/ml) y concentración mínima de proteína para generar una aglutinación (µg/ml) (Debray, et al., 1981).

### **Afinidad a carbohidratos**

La afinidad para carbohidratos se obtuvo al comparar la actividad inhibidora de varios carbohidratos en la hemaglutinación inducida por la lectina. Los resultados se expresan como la mínima concentración requerida para inhibir completamente la actividad de la lectina a estudiar (Debray, et al., 1981). Los carbohidratos utilizados fueron: galactosa, N-Acetilgalactosamina, galactosa acetilada, glucosa, N-Acetilglucosamina, fucosa, manosa, fructosa, xilosa, sacarosa, ribosa, lactosa, ácido siálico y maltosa.

### **Electroforesis SDS-PAGE**

Se analizó el grado de pureza y peso molecular de las proteínas presentes en la fracción proteica mediante una electroforesis SDS-PAGE al 12% con tinción de plata. Utilizando como marcador de peso molecular el ColorBurst Electroforesis Marker SIGMA (8,000-210,000).

### **Punto isoeléctrico**

Para determinar el punto isoeléctrico de la lectina se realizó un isoelectroenfoque utilizando un gel IEF 5-8 y un kit de marcadores Broad pl Kit pH 3-10 con un equipo de separación y control de unidades PhastSystem.

### **3. CATETERIZACIÓN**

Se utilizó un modelo animal de ratas macho Wistar (300-500g) a las cuales se les colocó un catéter en la vena yugular para la obtención repetida de sangre a diferentes tiempos. El catéter utilizado se forma con dos tuberías, una de 13 cm de polietileno (0.58 mm DI/0.96 mm OD) y otra de 4.5 cm de silicona (0.64 mm DI/1.19 mm OD); como anestésico se utilizó una mezcla de Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (5 mg/kg); como antiséptico alcohol al 70% y una solución de yodopovidona al 9%; como antibiótico Gentamicina (1.6 mg/kg); como anticoagulante una solución de heparina (150 IU/ml). Después de la cirugía se dejó descansar a los animales por 7 días con agua y alimento *ad libitum* (Peternel, *et al.*, 2010; Thrivikraman, *et al.*, 2002).

### **4. INDUCCIÓN DE FIEBRE**

Se administró una inyección subcutánea de una solución de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza comercial) al 20% a una dosis de 8 g/kg de peso corporal. Las temperaturas rectales se midieron con termómetros digitales OMRON en todos los grupos 18 horas después de la inyección de la solución de levadura para asegurar la actividad pirética (García-González, *et al.*, 2007).



## **5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA**

A los animales con fiebre se les administró por vía oral mediante una sonda intragástrica (Animal feeding needles, 16X3''(76.2mm)W/3, Cadence science, Inc.) el tratamiento correspondiente a cada grupo (n=6 por grupo).

Grupo 1, solución salina al 0.9% (10 ml/kg de peso corporal); grupo 2, solución de paracetamol (320 mg/kg de peso corporal) (Li, *et al.*, 2008); grupo 3, solución de nimesulida (100 mg/kg de peso corporal) (Suleyman, *et al.*, 2008); grupo 4, extracto crudo de flor de jamaica (7.36 mg de proteína/kg de peso corporal); grupo 5, fracción proteica de flor de jamaica (9.35 mg de proteína/kg de peso corporal); grupo 6, solución de pigmentos de flor de jamaica al 20% (10ml/kg de peso corporal); grupo 7, Sham (sin inducción de fiebre y sin tratamiento).

Se realizaron diez mediciones de las temperaturas rectales, una basal (antes de la inducción de fiebre), y a los tiempos 0 (febril), 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 24 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos.

## **6. EVALUACIÓN DE CITOCINAS Y PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> CIRCULANTES**

Se extrajo sangre de las ratas por medio del catéter, una basal (antes de la inducción de fiebre), y a los tiempos 0 (febril), 1, 1.5, 2, 3 y 24 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos. En cada extracción de sangre se repuso el volumen con solución fisiológica al 0.9% estéril para evitar un choque hipovolémico (Morton, *et al.*, 1993). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se separaron los sueros, los cuales se distribuyeron en alícuotas de 100 µl y se congelaron a -70°C hasta su evaluación.

Se realizaron ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich utilizando estuches PeproTech para evaluar las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6; y estuches R & D Systems para evaluar las concentraciones de prostaglandina E<sub>2</sub> siguiendo las instrucciones del proveedor.

## **7. EUTANASIA**

Se anestesió de forma terminal al animal con pentobarbital sódico (150 mg/kg) y se perfundió con una solución de lavado (solución salina 0.9%) y posteriormente con una solución fijadora (paraformaldehído al 4%). Se decapitó al animal y se retiró el cerebro, conservándolo en solución de paraformaldehído al 4% por 24 horas a una temperatura de 4°C y posteriormente en una solución de sacarosa al 20% almacenado a 4°C.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó la estadística descriptiva para ordenar y analizar los datos, para ello se sacó media y error estándar de los datos obtenidos. Para la comparación intragrupo de los datos de temperaturas y citocinas se utilizaron las ANOVA de una vía con ajuste *post hoc* de Dunnett estableciendo como columna control la medición basal de cada grupo. Para la comparación entre los diferentes grupo se utilizaron las ANOVA de dos vías con ajuste *post hoc* de Tukey. En ambos casos se consideró una significancia de  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

Se cuantifico proteínas por el método de Bradford para el extracto crudo y fracción proteica, el extracto crudo presentó una concentración de 0.736 mg/ml, mientras que la fracción proteica contiene una concentración de 0.935 mg/ml.

Para explorar la presencia de lectinas tanto en el extracto crudo, como en la fracción proteica, se realizaron ensayos de hemaglutinación empleando los cuatro grupos sanguíneos humanos. En el extracto crudo se observó actividad para los cuatro grupos sanguíneos (tabla 5), mientras que para la fracción proteica se observó actividad solo para el grupo A<sub>1</sub> (tabla 6).

**Tabla 5.** Actividad hemaglutinante del extracto crudo de jamaica

Grupo sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	133,120 ± 42,397	180,869 ± 57,605	0.49 ± 0.19
A <sub>2</sub>	76,800 ± 40,592	104,347 ± 55,153	0.94 ± 0.43
B	122,880 ± 43,788	166,956 ± 59,494	0.54 ± 0.19
O	92,160 ± 60,950	125,217 ± 82,813	0.94 ± 0.54

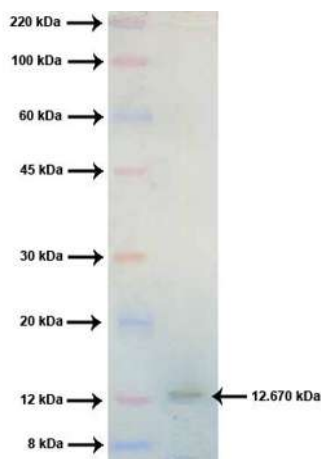
Los resultados representan la media ± DE (n=8) de ensayos independientes, con una concentración de proteína de 0.736 mg/ml. UHE: Unidades de hemaglutinación, AE: Actividad específica (UHE/mg de proteína) y C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación (µg/ml).

**Tabla 6.** Actividad hemaglutinante de la fracción proteica de jamaica

Grupo sanguíneo	UHE	AE	C
A <sub>1</sub>	163,840 ± 0.0	175,230 ± 0.0	0.00045 ± 0.0
A <sub>2</sub>	0	0	0
B	0	0	0
O	0	0	0

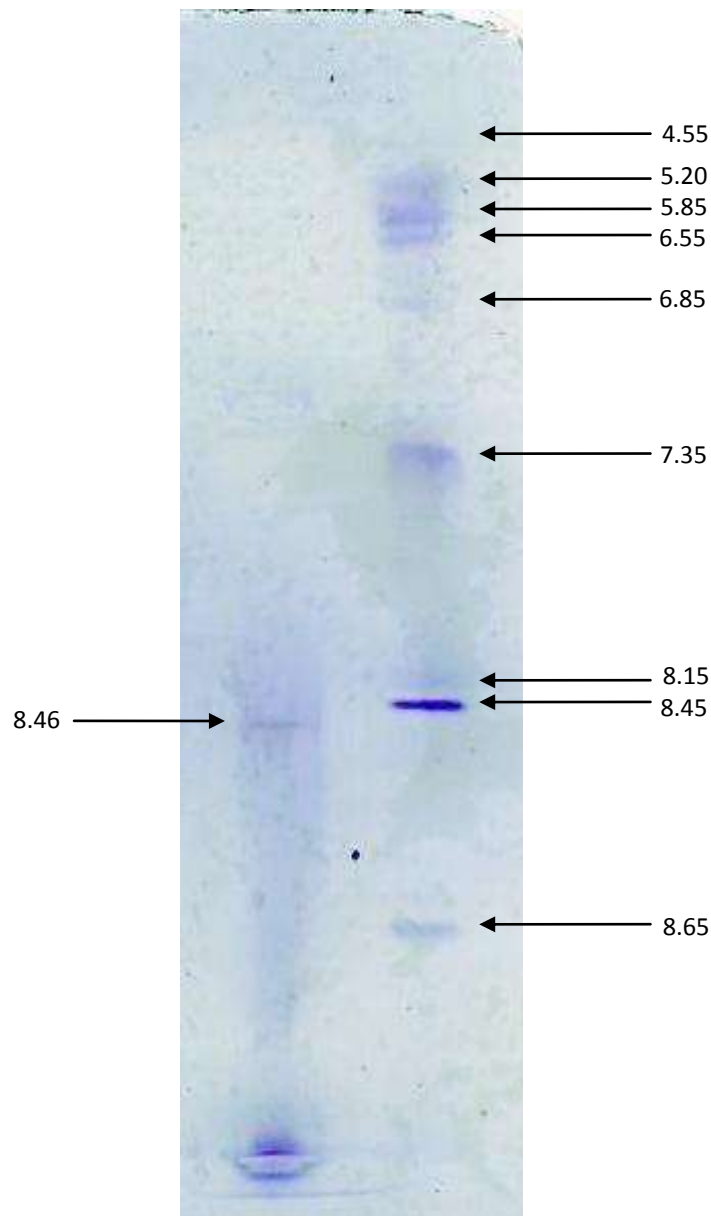
Los resultados representan la media ± DE (n=4) de ensayos independientes, con una concentración de proteína de 0.935 mg/ml. UHE: Unidades de hemaglutinación, AE: Actividad específica (UHE/mg de proteína) y C: concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación (µg/ml).

Al encontrar actividad solo para un grupo sanguíneo en la fracción proteica se analizó el grado de pureza y peso molecular de las proteínas presentes en mediante una electroforesis SDS-PAGE al 12% con tinción de plata y se observó solamente una banda, como se muestra en la figura 1, con un peso molecular aparente de 12.670 kDa a la cual denominamos lectina de *Hibiscus sabdariffa* L (HSL por Hibiscus sabdariffa lectin).



**Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de la fracción proteica de jamaica:** Se muestra una electroforesis SDS-PAGE al 12% con tinción de plata. Utilizando como marcador de peso molecular el ColorBurst Electroforesis Marker SIGMA (8,000-220,000), SIGMA. Como se puede observar se cuenta con una sola banda de 12,670±1164 Da (n=4).

Posteriormente se realizó un isoelectroenfoco para determinar el punto isoeléctrico de HSL, se utilizaron los siguientes marcadores con pI conocido: Inhibidor de tripsina - 4.55, b-Lactoglobulina A - 5.20, Anhidrasa carbónica B (bovino) - 5.85, Anhidrasa carbónica B (humano) - 6.55, Mioglobina ácida - 6.85, Mioglobina básica - 7.35, Lectina de lenteja ácida - 8.15, Lectina de lenteja neutra - 8.45, Lectina de lenteja básica - 8.65. Como se puede observar en la figura 2, se encontró una banda con un punto isoeléctrico de 8.46.



**Figura 2. Isoelectroenfoco de HSL.** Se muestra un isoelectroenfoco en gel de 5-8 pI, utilizando el Broad pI kit, pH 3-10. Se observa una banda con pI de 8.46.

Para determinar la afinidad a carbohidratos que tiene la lectina encontrada en la fracción proteica se comparó la actividad inhibidora de varios carbohidratos en la hemaglutinación inducida por dicha lectina. Los resultados se muestran en la tabla 7, donde la afinidad de la fracción proteica de mayor a menor fue la siguiente: GalNAc> Gal> Glc> Gal Acet> GlcNAc> Fuc> Man> Xyl> Sac> Rub> Lac> NANA> Maltosa> Man> Fruc.

**Tabla 7.** Afinidad a carbohidratos de la lectina HSL

Carbohidrato	Fracción proteica
GalNAc	4.7684E-05
Gal	50
Glc	100
Gal Acet	200
GlcNAc	200
Fuc	200
Man	200
Xyl	200
Sac	200
Rub	200
Lac	200
NANA	200
Maltosa	200
Man	200
Fruc	200

Los resultados representan la mínima concentración de carbohidratos (mmol) que se requiere para inhibir completamente la actividad hemaglutinante.

## 2. INDUCCIÓN DE FIEBRE

Se indujo la fiebre con una inyección subcutánea de una solución al 20% de levadura de cerveza y se midió la temperatura a las 18 horas para comprobar el efecto pirético. Los resultados se muestran en la tabla 8 para los grupos solución salina, paracetamol, nimesulida, extracto crudo, fracción proteica y pigmentos.

**Tabla 8.** Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza

Grupo: Solución salina				Grupo: Paracetamol			
Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )	Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )
1	36.0	37.4	1.4	1	36.3	37.4	1.1
2	36.5	37.7	1.2	2	34.6	37.1	2.5
3	36.2	37.3	1.1	3	36.4	37.9	1.5
4	36.0	37.2	1.2	4	36.7	37.6	0.9
5	36.5	37.0	0.5	5	36.9	37.8	0.9
6	35.9	37.0	1.1	6	36.9	38.4	1.5

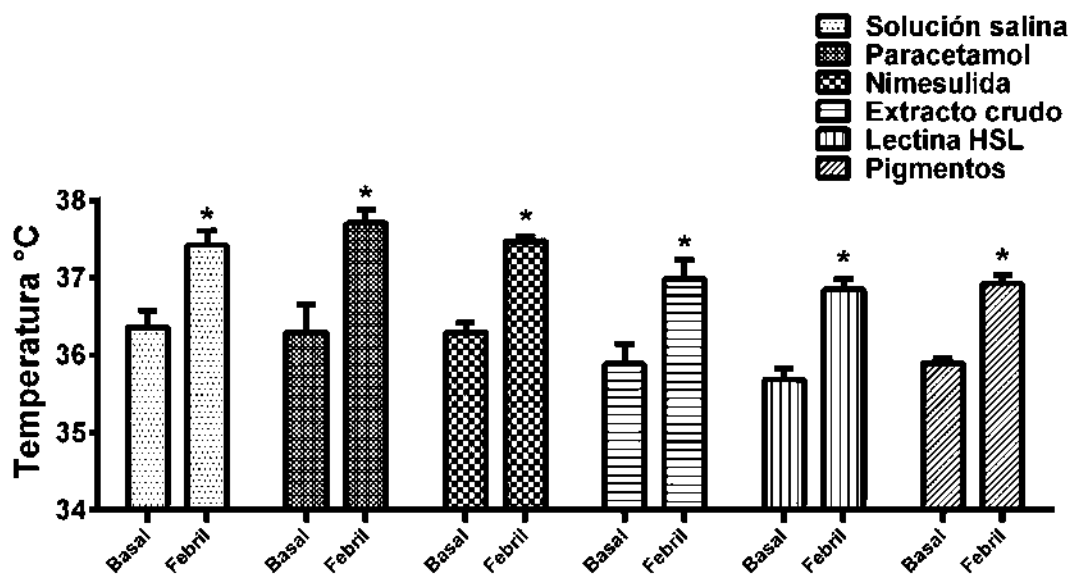
  

Grupo: Lectina HSL				Grupo: Extracto crudo			
Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )	Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )
1	36.2	37.4	1.2	1	34.9	35.9	1
2	35.3	36.6	1.3	2	36.8	37.5	0.7
3	35.6	36.9	1.3	3	35.5	36.7	1.2
4	35.4	36.5	1.1	4	35.9	37.5	1.6
5	35.6	37.0	1.4	5	36.3	37.3	1.0
6	36.0	36.7	0.7	6	35.9	37.0	1.1

Grupo: Pigmentos				Grupo: Nimesulida			
Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )	Rata	Basal (°C)	Febril (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )
1	36.0	37.2	1.2	1	36.6	37.4	0.8
2	36.0	36.9	0.9	2	36.0	37.6	1.6
3	35.7	36.7	1.0	3	36.3	37.4	1.1
4	35.9	36.9	1.0	4	36.3	37.5	1.2

Para comparar los datos se inició con una prueba de normalidad para saber si los datos seguían una distribución normal, la prueba empleada fue el test de Kolmogorov-Smirnov (KS) y arrojó que los datos seguían una distribución normal, esto permitió utilizar pruebas paramétricas. Se comparó la temperatura basal contra la febril de cada grupo a los que se les indujo fiebre, para ello se utilizaron pruebas t para datos pareados con una significancia de  $p < 0.05$ , se puede observar que hay una diferencia significativa entre la temperatura basal y la febril de todos los grupos (figura 3).



**Figura 3. Incremento de la temperatura rectal inducido con levadura de cerveza:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba t, \* $p < 0.05$  basal vs. Febril.

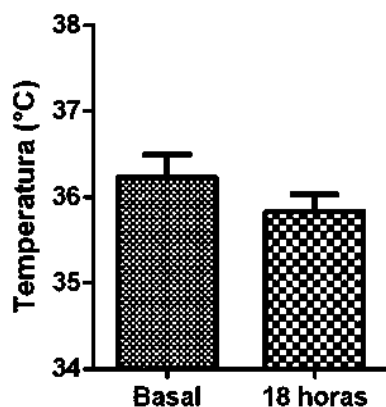
El grupo Sham es un grupo control al que no se le indujo fiebre, se midió su temperatura basal y 18 horas después de la toma basal. Los datos se muestran en la tabla 9.



**Tabla 9.** Temperaturas del grupo Sham

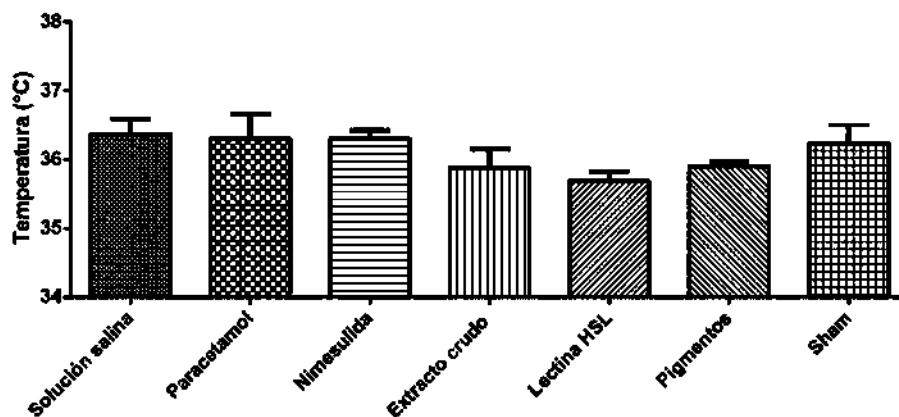
Grupo: Sham			
Rata	Basal (°C)	18 h (°C)	$\Delta T$ ( $T_b - T_f$ )
1	37.0	36.2	-0.8
2	35.6	35.2	-0.4
3	36.9	35.6	-1.3
4	35.5	35.4	-0.1
5	35.9	36.2	0.3
6	36.5	36.4	-0.1

Se compararon ambas temperaturas mediante una prueba t para datos apareados con una significancia de  $p < 0.05$ , encontrando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas (figura 4).



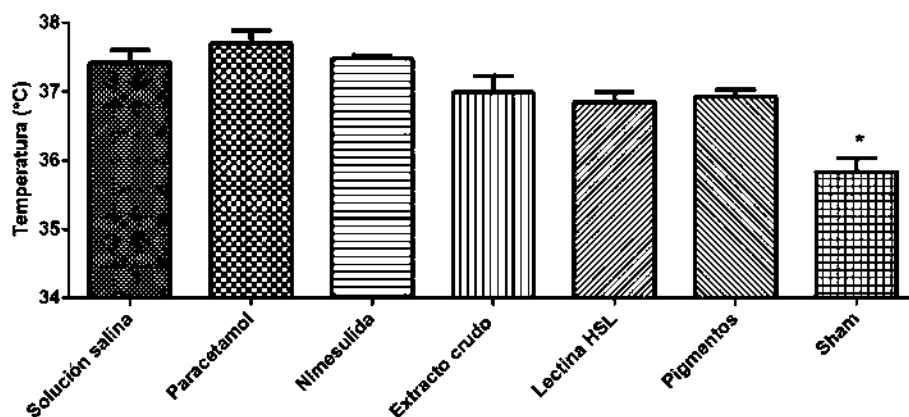
**Figura 4.** Temperatura basal y 18 horas después de la toma basal: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba t,  $*p < 0.05$  basal vs. 17 h.

Por otro lado se compararon entre si las temperaturas basales de todos los grupos para asegurar que hubiera homogeneidad entre ellos. Los datos se muestran en la figura 5, se utilizó un ANOVA de una vía para datos no apareados encontrando que no había diferencia estadísticamente significativa entre cada grupo.



**Figura 5. Temperatura basal de todos los grupos:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía,  $*p < 0.05$ . No hay diferencia estadísticamente significativa.

De igual manera se compararon entre si las temperaturas febriles de todos los grupos y la temperatura a las 18 horas de la toma basal del grupo Sham. Los datos se muestran en la figura 6, se utilizó un ANOVA de una vía para datos no pareados, con una comparación múltiple de Tukey encontrando que había diferencia estadísticamente significativa entre la temperatura del grupo Sham y el resto de las columnas.



**Figura 6. Temperatura a las 18 horas (febril) de todos los grupos:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Tukey,  $*p < 0.05$  comparación múltiple.

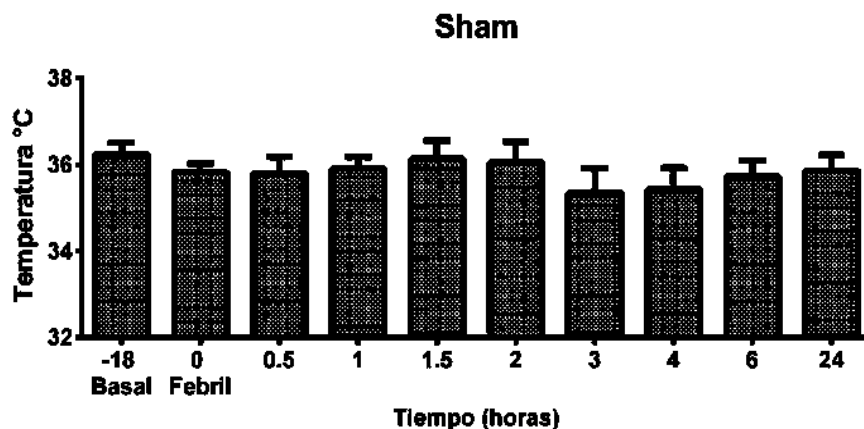
### 3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA

A aquellos animales que estaban con fiebre se les administró el tratamiento correspondiente a cada grupo, a excepción del grupo Sham al cual no se le indujo fiebre ni se le administró tratamiento, este grupo tiene la finalidad de evaluar el efecto que tiene sobre la temperatura rectal la extracción de sangre, el estrés provocado al animal por manipulación, el ciclo circadiano y condiciones ambientales. Los resultados se muestran en la tabla 10; los tiempos evaluados son una temperatura en condiciones basales; un tiempo que denominaremos tiempo cero (18 horas después de la toma basal) donde se administra el tratamiento; y a las 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 24 horas después del tratamiento.

**Tabla 10.** Monitoreo de la temperatura del grupo Sham

Grupo: Sham										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	37.0	36.2	36.1	36.4	36.4	36.5	34.9	36.2	35.5	34.4
2	35.6	35.2	34.7	35	34.9	34.2	33.2	33.8	34.7	35.8
3	36.9	35.6	36.1	36.0	36.6	36.9	35.7	36.1	36.5	35.6
4	35.5	35.4	34.4	35.2	34.9	35.0	34.7	34.0	34.7	36.0
5	35.9	36.2	36.9	36.2	36.6	36.6	36.7	36.0	36.4	36.6
6	36.5	36.4	36.5	36.7	37.4	37.1	36.9	36.5	36.6	36.8
Media	36.23	35.83	35.78	35.92	36.13	36.05	35.35	35.43	35.73	35.87
Error estándar	0.26	0.20	0.41	0.27	0.41	0.47	0.56	0.49	0.36	0.34

Se comparó la temperatura a lo largo del tiempo monitoreado para evaluar si se modificaba la temperatura basal, para ello se aplicó una ANOVA de una vía para datos pareados con una prueba *post hoc* de Dunnett tomando como columna control la temperatura basal. Los datos se representan en la figura 7 donde se puede ver que hay variaciones en la temperatura a lo largo del tiempo pero que estas no resultaron ser estadísticamente significativas.

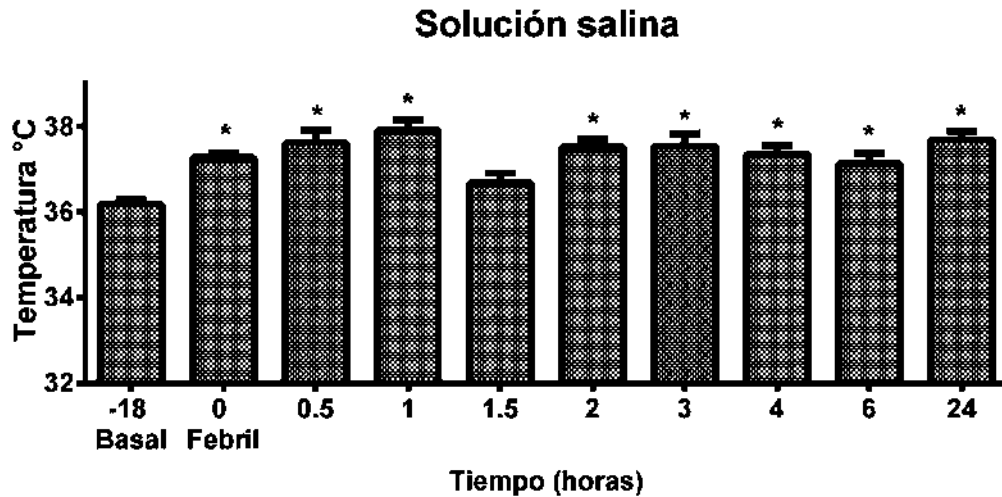


**Figura 7. Monitoreo de la temperatura del grupo Sham.** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

En cuanto a los grupos a los que si se les indujo fiebre y administro tratamiento, se evaluaron varios grupos control, uno de esos es el de solución salina, un control negativo, el cual permitió determinar el desarrollo natural de la fiebre sin contrarrestarlo con ningún fármaco. En la tabla 11 se muestran los datos obtenidos del monitoreo. Para comparar las columnas se aplicó una ANOVA de una vía para datos pareados con una prueba *post hoc* de Dunnett tomando como control la temperatura basal, y como se puede observar en la figura 8 se observa un descenso de la temperatura a las 1.5 horas el cual resultado ser igual estadísticamente a la temperatura basal.

**Tabla 11. Monitoreo de la temperatura del grupo solución salina**

Grupo: Solución salina										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	36.0	37.4	37.4	37.9	36.1	38.1	38.9	38.3	38.3	38.1
2	36.5	37.7	36.9	37.3	36.1	36.7	37.5	37.4	37.0	36.9
3	36.2	37.3	37.6	37.9	36.7	37.5	37.4	37.0	37.0	37.7
4	36.0	37.2	36.9	37.6	37.2	37.8	37.5	37.4	37.0	37.9
5	36.5	37.0	38.8	39.1	36.4	37.6	37.1	37.0	36.5	38.2
6	35.9	37.0	38.1	37.6	37.5	37.4	36.9	37.0	37.0	37.3
Media	36.18	37.27	37.62	37.90	36.67	37.52	37.55	37.35	37.13	37.68
Error estándar	0.10	0.10	0.30	0.25	0.23	0.19	0.28	0.20	0.24	0.20

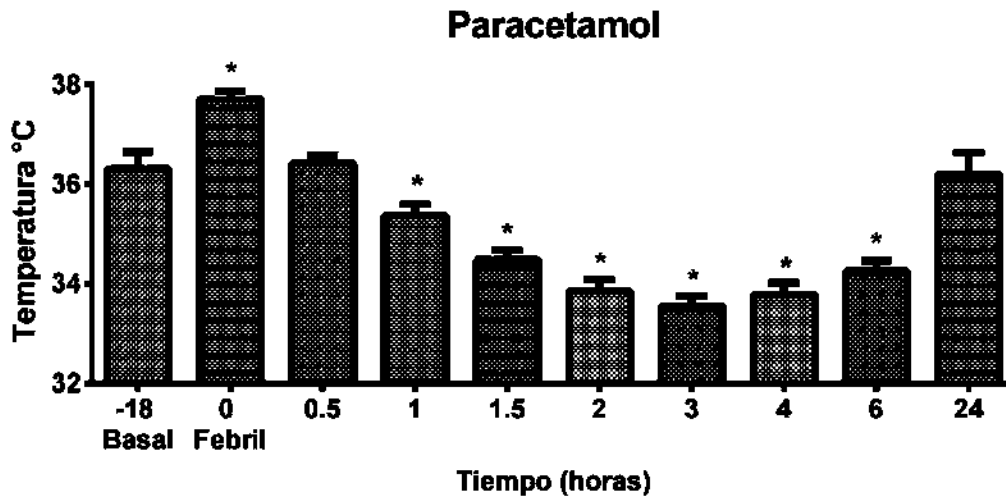


**Figura 8. Monitoreo de la temperatura del grupo solución salina:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

Otros grupos control son el de paracetamol y nimesulida ambos controles positivos, el grupo de paracetamol permite determinar el efecto antipirético, este es un inhibidor no selectivo de la COX, por lo que está inhibiendo tanto a COX-1 como a COX-2, y posiblemente a una tercer isoforma COX-3. En la tabla 12 se muestran los datos obtenidos del monitoreo. Para comparar las columnas se aplicó una ANOVA de una vía para datos pareados con una prueba *post hoc* de Dunnett tomando como control la temperatura basal, y como se puede observar en la figura 9 se ve un descenso de la temperatura desde las 0.5 horas donde se iguala a la basal, sin embargo a partir de 1 hora hasta las 6 horas la temperatura permanece por debajo de la basal, es decir, con hipotermia.

**Tabla 12.** Monitoreo de la temperatura del grupo paracetamol

Grupo: Paracetamol										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febrial	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	36.3	37.4	36.4	36.1	34.3	33.6	33.9	33.8	34.7	36.1
2	34.6	37.1	37.0	35.4	34.6	34.5	33.6	33.5	33.4	35.0
3	36.4	37.9	36.7	35.8	34.8	34.1	33.8	34.4	34.4	35.8
4	36.7	37.6	36.1	34.7	33.7	33.5	32.5	32.8	33.8	35.7
5	36.9	37.8	35.8	34.8	34.4	33.0	33.8	34.3	34.6	36.5
6	36.9	38.4	36.5	35.4	35.1	34.4	33.7	33.9	34.6	38.1
Media	36.30	37.70	36.42	35.37	34.48	33.85	33.55	33.78	34.25	36.20
Error estándar	0.35	0.18	0.17	0.22	0.19	0.23	0.21	0.23	0.21	0.43

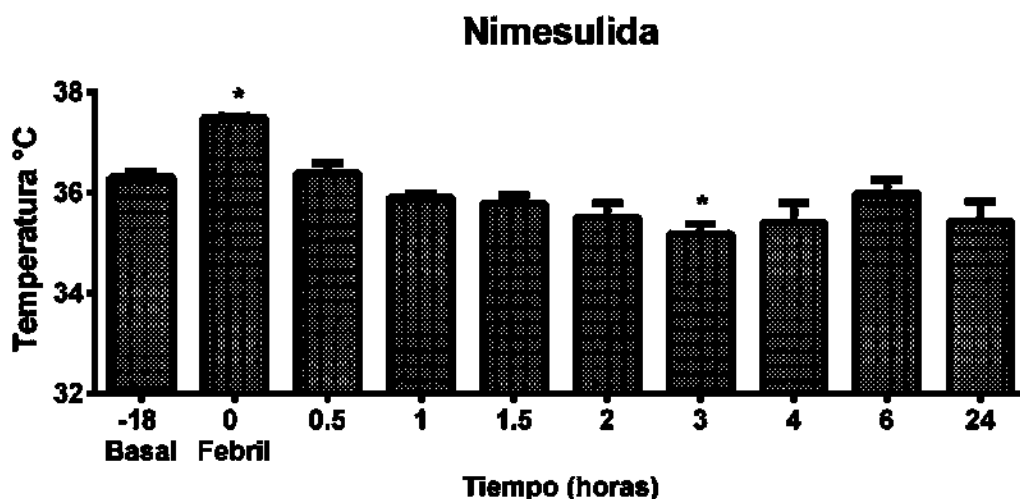


**Figura 9.** Monitoreo de la temperatura del grupo paracetamol: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

Por otro lado el grupo de nimesulida también permite determinar el efecto antipirético, sin embargo este es un inhibidor selectivo de la COX-2. En la tabla 13 se muestran los datos obtenidos del monitoreo. Para comparar las columnas se aplicó una ANOVA de una vía para datos pareados con una prueba *post hoc* de Dunnett tomando como control la temperatura basal, y como se puede observar en la figura 10 se ve un descenso de la temperatura desde las 0.5 horas donde se iguala a la basal permaneciendo así hasta las 3 horas donde hay una diferencia significativa con respecto a la basal y por lo tanto hay hipotermia, posteriormente se normaliza a las 4 horas y permanece estable hasta el final del experimento.

**Tabla 13.** Monitoreo de la temperatura del grupo nimesulida

Grupo: Nimesulida										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	36.6	37.4	36.3	36.1	36.1	36.3	35.7	35.9	36.4	34.6
2	36.0	37.6	36.9	35.7	35.3	35.0	34.7	34.3	35.2	35.2
3	36.3	37.4	35.9	35.9	35.9	35.2	35.1	36.0	36.3	36.5
4	36.3	37.5	36.4	35.9	35.8	35.5	35.2	35.4	36.0	35.4
Media	36.30	37.48	36.38	35.90	35.78	35.50	35.18	35.40	35.98	35.43
Error estándar	0.12	0.04	0.20	0.08	0.17	0.28	0.20	0.38	0.27	0.39



**Figura 10.** Monitoreo de la temperatura del grupo nimesulida: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

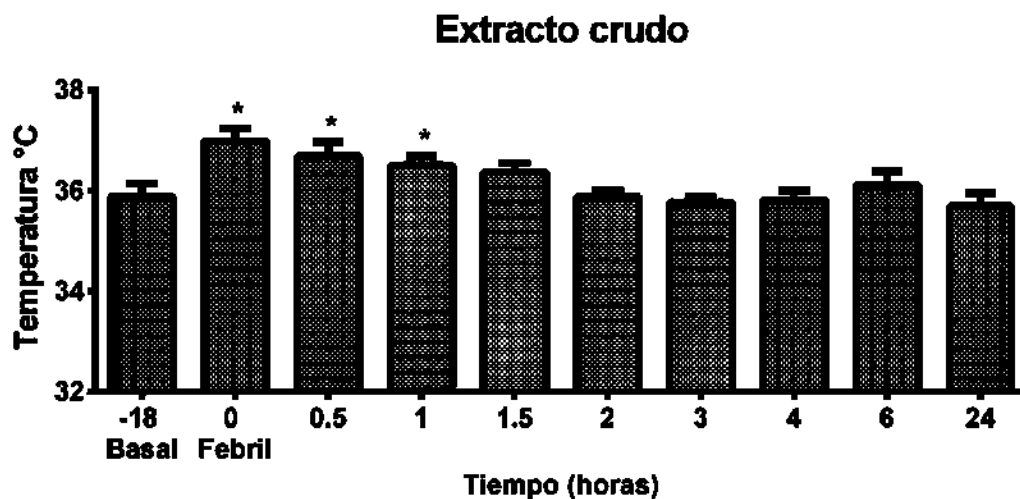
En cuanto a los extractos de jamaica se probaron cuatro diferentes: extracto crudo, pigmentos, la lectina HSL y otro donde se le agregó galactosa a la lectina HSL para inhibir su función biológica. En el extracto crudo se puede observar que a las 1.5 horas la temperatura regresa a su valor basal y permanece constante hasta el final del experimento (tabla 14 y figura 11); la lectina HSL ejerció un efecto más rápido que el extracto crudo ya que al transcurrir 1 hora quitó la fiebre y permaneció así hasta el final (tabla 15 y figura 12); la lectina + galactosa no quitó la fiebre durante el monitoreo solo hasta las 24 horas regresó a su valor basal (tabla 16 y figura 13); y finalmente el grupo de pigmentos resultó ser el extracto más efectivo como antipirético ya que desde las 0.5 horas restableció la temperatura basal permaneciendo así hasta concluir el experimento (tabla 17 y figura 14).

Para comparar las columnas se aplicó una ANOVA de una vía para datos pareados con una prueba *post hoc* de Dunnett tomando como control la temperatura basal.



**Tabla 14.** Monitoreo de la temperatura del grupo extracto crudo

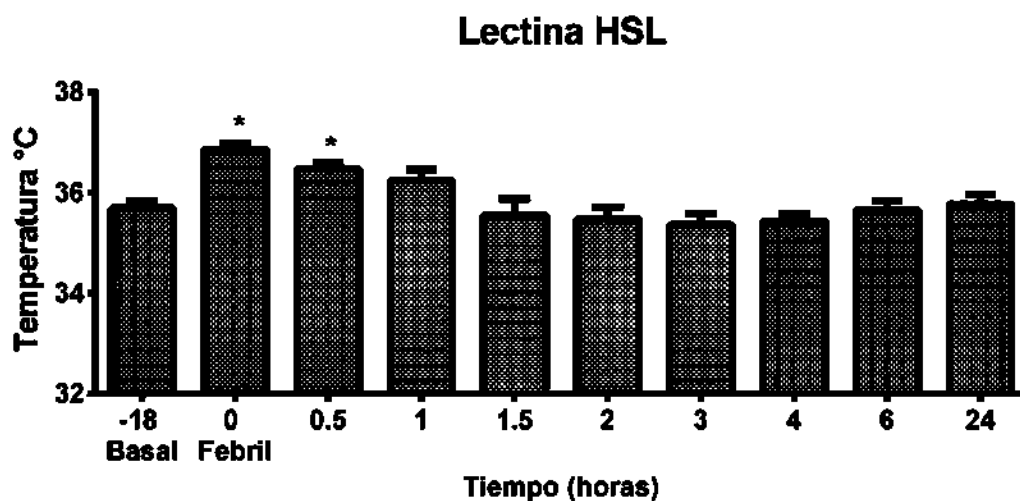
Grupo: Extracto crudo										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	34.9	35.9	35.9	36.7	36.1	35.9	35.5	35.2	35.0	34.8
2	36.8	37.5	37.6	37.0	36.4	35.7	35.7	36.4	36.5	36.0
3	35.5	36.7	35.9	35.9	36.1	35.5	35.5	35.4	35.6	35.6
4	35.9	37.5	37.3	36.8	37.2	36.4	36.2	36.1	36.7	35.3
5	36.3	37.3	36.7	36.1	36.0	35.9	35.9	36.0	36.7	36.7
6	35.9	37.0	36.7	36.5	36.4	35.9	35.8	35.8	36.1	35.7
Media	35.88	36.98	36.68	36.50	36.37	35.88	35.77	35.82	36.10	35.68
Error estándar	0.26	0.25	0.28	0.17	0.18	0.12	0.10	0.18	0.27	0.26



**Figura 11.** Monitoreo de la temperatura del grupo extracto crudo: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

**Tabla 15.** Monitoreo de la temperatura del grupo Lectina HSL

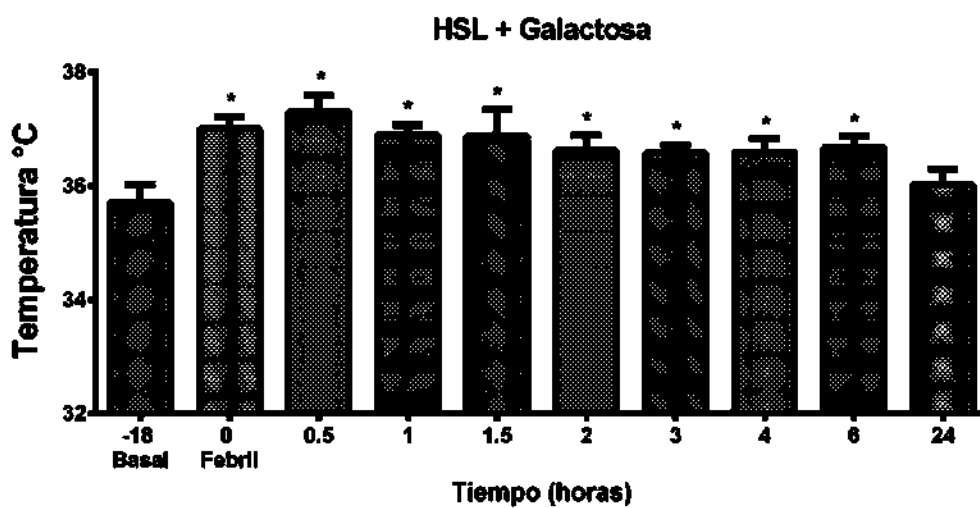
Grupo: Lectina HSL										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	36.2	37.4	37.0	36.5	35.0	35.2	35.1	35.5	36.2	36.3
2	35.3	36.6	36.5	36.9	36.5	36.2	35.9	35.6	35.2	35.6
3	35.6	36.9	36.2	35.8	34.6	34.5	35.0	35.2	35.6	35.0
4	35.4	36.5	36.4	35.7	35.0	35.3	35.1	35.1	35.4	35.8
5	35.6	37.0	36.1	35.8	35.7	35.7	34.8	35.2	35.3	35.7
6	36.0	36.7	36.6	36.7	36.5	35.9	36.2	36.0	36.2	36.2
Media	35.68	36.85	36.47	36.23	35.55	35.47	35.35	35.43	35.65	35.77
Error estándar	0.14	0.13	0.13	0.21	0.33	0.24	0.22	0.13	0.18	0.19



**Figura 12.** Monitoreo de la temperatura del grupo Lectina HSL: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

**Tabla 16.** Monitoreo de la temperatura del grupo HSL + Galactosa

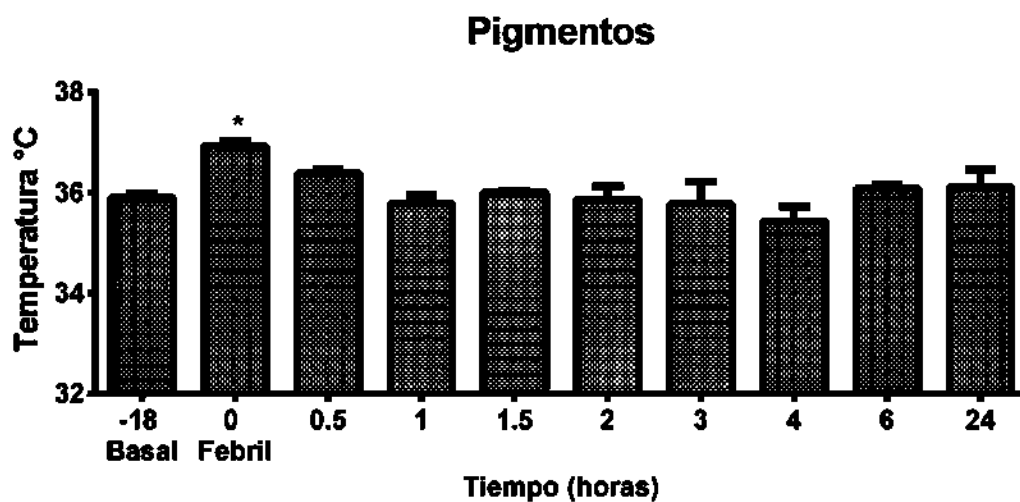
Grupo: HSL + Galactosa										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	35.3	36.7	36.5	36.8	35.6	36.2	36.4	36.0	36.2	35.6
2	36.3	36.7	37.8	37.3	37.7	37.4	36.4	37.0	37.0	36.5
3	36.2	37.0	37.3	37.0	36.8	36.5	36.5	36.9	37.0	36.5
4	35.0	37.6	37.6	36.5	37.4	36.4	37.0	36.5	36.5	35.5
Media	35.70	37.00	37.30	36.90	36.88	36.63	36.58	36.60	36.68	36.03
Error estándar	0.32	0.21	0.28	0.16	0.46	0.26	0.14	0.22	0.19	0.27



**Figura 13.** Monitoreo de la temperatura del grupo HSL + Galactosa: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. Basal.

**Tabla 17.** Monitoreo de la temperatura del grupo pigmentos

Grupo: Pigmentos										
Rata	Tiempo (horas)									
	-18 Basal	0 Febril	0.5	1	1.5	2	3	4	6	24
1	36.0	37.2	36.6	36.1	36.1	36.0	36.0	35.8	35.9	36.9
2	36.0	36.9	36.2	35.3	35.9	36.4	36.7	35.9	36.0	36.2
3	35.7	36.7	36.3	35.9	36.0	35.2	34.6	34.6	36.3	35.2
4	35.9	36.9	36.4	35.8	36.0	35.9	35.8	35.4	36.1	36.1
Media	35.90	36.93	36.38	35.78	36.00	35.88	35.78	35.43	36.08	36.10
Error estándar	0.07	0.10	0.08	0.17	0.04	0.24	0.43	0.29	0.08	0.34



**Figura 14.** Monitoreo de la temperatura del grupo pigmentos: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA una vía *post hoc* Dunnett, \* $p < 0.05$  vs. basal.

Posteriormente se compararon entre si los diferentes grupos, se utilizó una ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Tukey para los 4 grupos control (solución salina, paracetamol, nimesulida y Sham) y otra para los 4 grupos experimentales (extracto crudo, pigmentos, lectina HSL y HSL + Galactosa), primero se compararon entre si los grupos control por un lado y posteriormente los grupos experimentales por otro. Dentro de los controles se observó que solo existía diferencia significativa entre el grupo de solución salina y el resto de los controles como se observa en la tabla 18; mientras que en los experimentales solo se observó diferencia entre el grupo de HSL + Galactosa y el resto de los grupos como se observa en la tabla 19.

**Tabla 18.** ANOVA 2 vías *post hoc* Tukey para los grupos control

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia de medias	95% CI de diferencias	¿Significancia?	
Solución salina vs. Paracetamol	2.123	1.178 a 3.069	Si	****
Solución salina vs. Nimesulida	1.383	0.3262 a 2.440	Si	**
Solución salina vs. Sham	1.413	0.4678 a 2.359	Si	**
Paracetamol vs. Nimesulida	-0.7400	-1.797 a 0.3172	No	Ns
Paracetamol vs. Sham	-0.7100	-1.656 a 0.2356	No	Ns
Nimesulida vs. Sham	0.03000	-1.027 a 1.087	No	Ns

**Tabla 19.** ANOVA 2 vías *post hoc* Tukey para los grupos experimental

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia de medias	95% CI de diferencias	¿Significancia?	
Extracto crudo vs. HSL	0.1217	-0.4411 a 0.6844	No	Ns
Extracto crudo vs. Pigmentos	0.1608	-0.4684 a 0.7900	No	Ns
Extracto crudo vs. HSL + Galactosa	-0.6442	-1.273 a -0.01498	Si	*
HSL vs. Pigmentos	0.03917	-0.5900 a 0.6684	No	Ns
HSL vs. HSL + Galactosa	-0.7658	-1.395 a -0.1366	Si	*
Pigmentos vs. HSL + Galactosa	-0.8050	-1.494 a -0.1158	Si	*

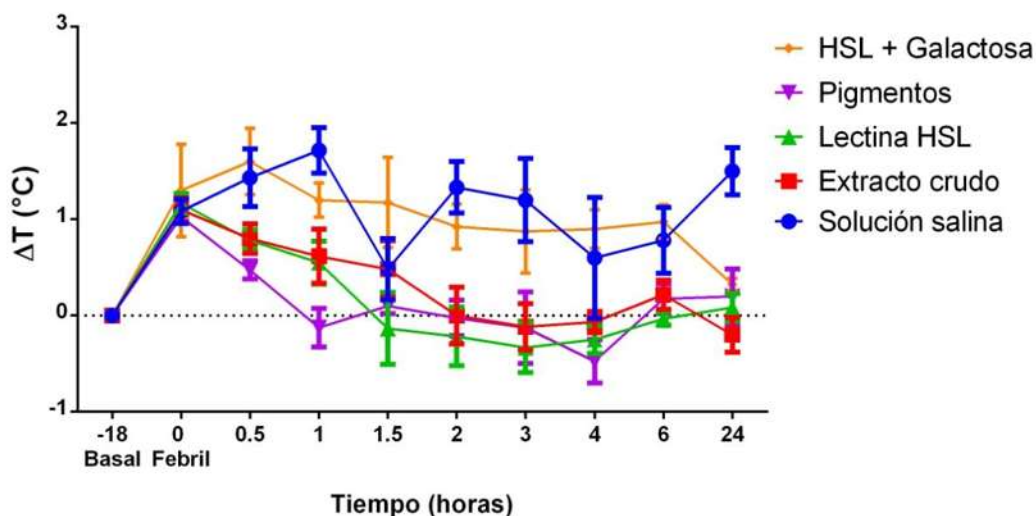
Finalmente se compararon cada uno de los grupos control contra los grupos experimentales de extractos de jamaica mediante una ANOVA de dos vías *post hoc* Dunnett. Se puede observar en la tabla 20 que el grupo solución salina resulto diferente estadísticamente del extracto crudo, pigmentos y lectina HSL, pero no así de HSL + Galactosa. Paracetamol resultó diferente de los cuatro grupos experimentales, mientras que nimesulida y Sham solo fueron diferentes al extracto crudo y a HSL + Galactosa.

**Tabla 20.** ANOVA 2 vías *post hoc* Dunnett Grupos control vs. Grupos experimental

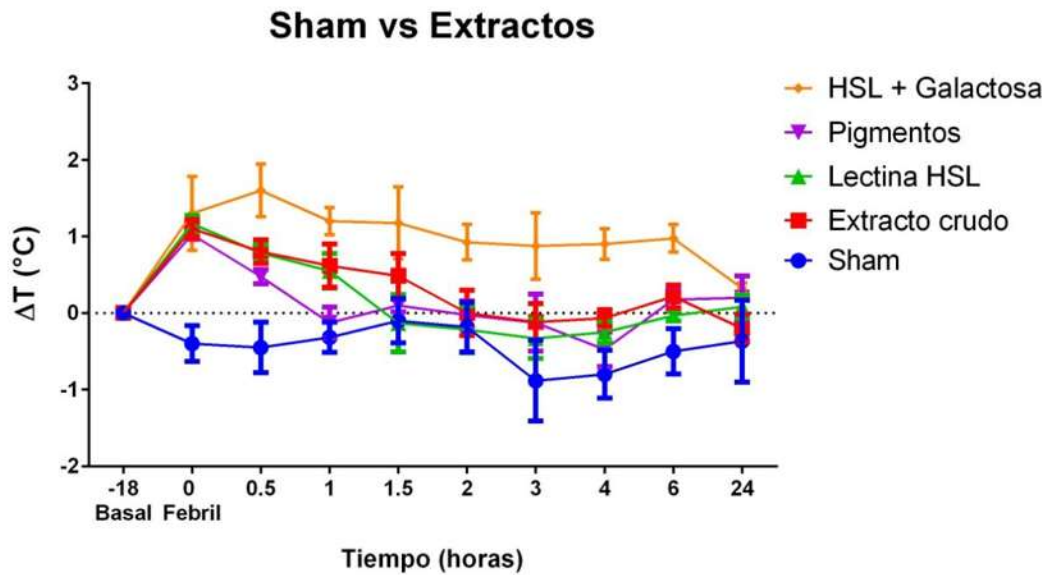
Comparación múltiple de Dunnett	Diferencia de medias	95% CI de diferencias	¿Significancia?	
<b>Solución salina</b>				
Solución salina vs. Extracto crudo	0.7300	0.1714 a 1.289	Si	**
Solución salina vs. Lectina HSL	0.8517	0.2931 a 1.410	Si	**
Solución salina vs. Pigmentos	0.8908	0.2663 a 1.515	Si	**
Solución salina vs. HSL + Galactosa	0.08583	-0.5387 a 0.7104	No	Ns
<b>Paracetamol</b>				
Paracetamol vs. Extracto crudo	-1.393	-2.132 a -0.6551	Si	***
Paracetamol vs. Lectina HSL	-1.272	-2.010 a -0.5335	Si	***
Paracetamol vs. Pigmentos	-1.233	-2.058 a -0.4072	Si	**
Paracetamol vs. HSL + Galactosa	-2.038	-2.863 a -1.212	Si	****
<b>Nimesulida</b>				
Nimesulida vs. Extracto crudo	-0.6533	-1.194 a -0.1124	Si	*
Nimesulida vs. Lectina HSL	-0.5317	-1.073 a 0.009261	No	Ns
Nimesulida vs. Pigmentos	-0.4925	-1.085 a 0.1001	No	Ns
Nimesulida vs. HSL + Galactosa	-1.297	-1.890 a -0.7049	Si	****
<b>Sham</b>				
Sham vs. Extracto crudo	-0.6833	-1.336 a -0.03064	Si	*
Sham vs. Lectina HSL	-0.5617	-1.214 a 0.09103	No	Ns
Sham vs. Pigmentos	-0.5225	-1.252 a 0.2072	No	Ns
Sham vs. HSL + Galactosa	-1.328	-2.057 a -0.5978	Si	***

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, Ns: No significativo

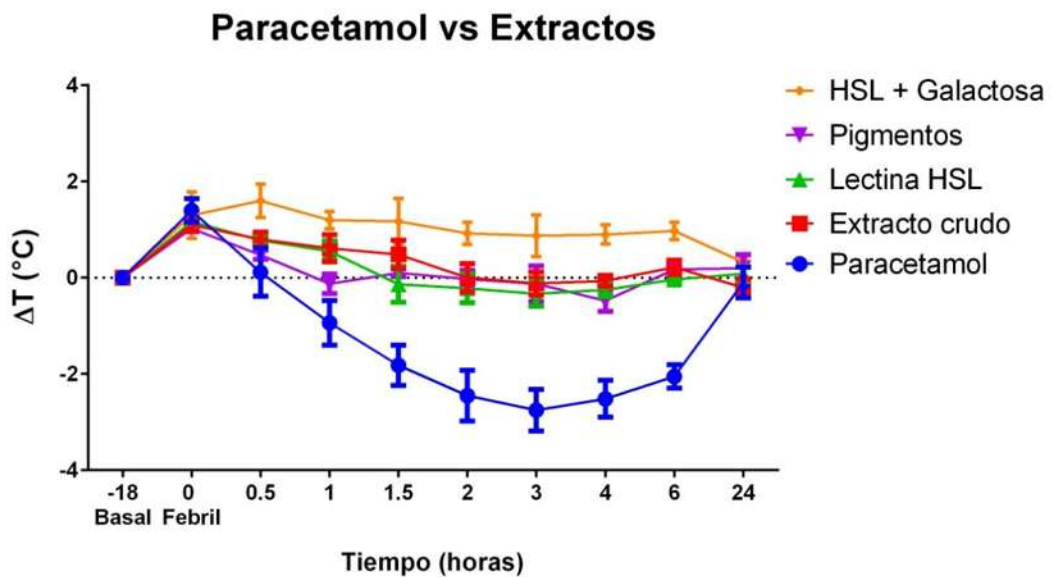
### Solución salina vs. Extractos



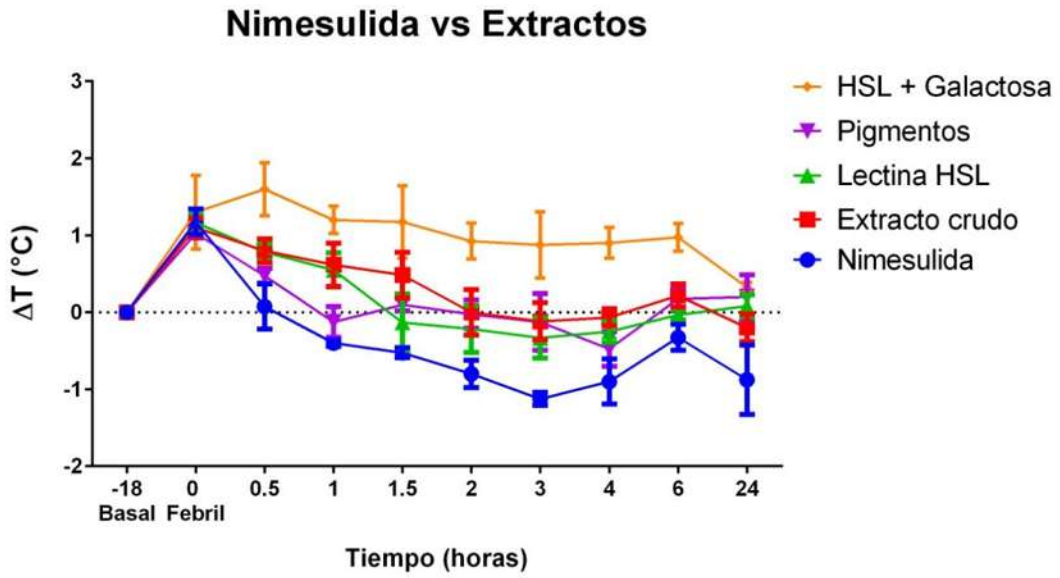
**Figura 15. Solución salina vs. Extractos de jamaica:** Los datos representan la media ± E.E. Prueba ANOVA dos vías *post hoc* Dunnett.



**Figura 16. Sham vs. Extractos de Jamaica:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA dos vías *post hoc* Dunnett.



**Figura 17. Paracetamol vs. Extractos de Jamaica:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA dos vías *post hoc* Dunnett.



**Figura 18. Nimesulida vs. Extractos de Jamaica:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba ANOVA dos vías *post hoc* Dunnett.



#### 4. EVALUACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES

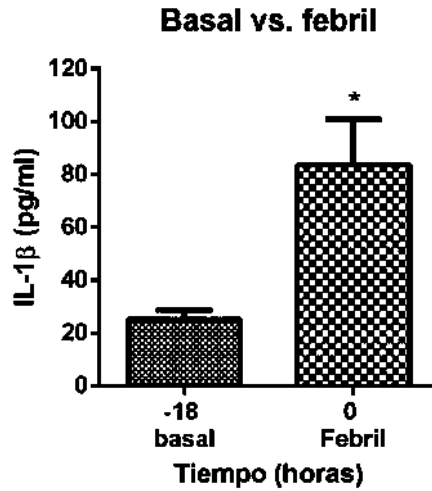
Se cuantificó la concentración de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 circulantes mediante ensayos ELISA en diferentes tiempos, uno basal (antes de la inducción de fiebre), y a los tiempos 0 (febril), 1, 1.5, 2, 3 y 24 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos.

##### Interleucina-1 $\beta$

Se agruparon los valores basales y febriles de todos los grupos excepto del grupo Sham para homogenizar los datos, los resultados se muestran en la tabla 21 y figura 19 donde se puede ver que es menor la concentración en el tiempo basal respecto del febril.

**Tabla 21.** Concentración basal y febril de IL-1 $\beta$

Concentración de IL-1 $\beta$ (pg/ml)					
Basal				Media	Error estándar
54.10	37.68	0.00	0.00	25.19	3.53
66.72	20.43	50.19	16.94		
18.07	16.94	49.24	14.80		
9.26	23.58	29.84	15.85		
44.61	17.50	25.59	22.93		
2.91	0.00	11.41	26.27		
0.00	45.51	71.23	-----		
18.07	20.43	25.59	-----		
Febril				Media	Error estándar
30.59	1.89	77.07	135.35	83.55	17.53
6.97	23.58	16.94	60.25		
19.82	52.13	3.63	294.64		
11.86	16.94	12.81	435.41		
24.91	109.77	102.76	202.36		
34.43	77.07	30.59	145.03		
8.46	89.45	42.82	253.88		
16.94	19.23	170.70	145.03		



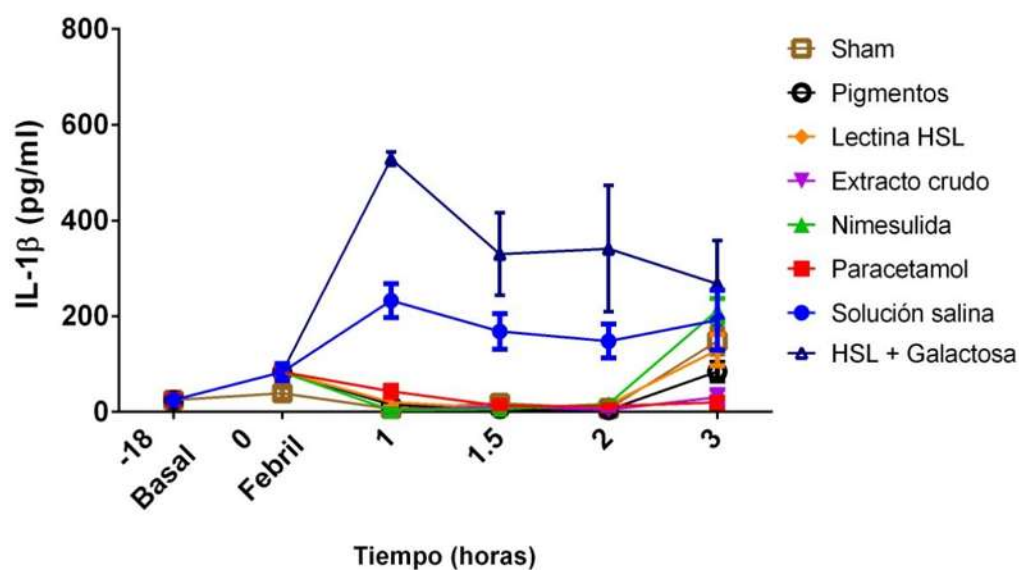
**Figura 19. Concentración basal vs febril de IL-1β:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba t, \* $p < 0.05$  basal vs. Febril.

Mientras que en la tabla 22 y figura 20 se muestra la media de la concentración  $\pm$  error estándar del resto de los tiempos de cada grupo, se puede observar que en el grupo de solución salina las concentraciones son más elevadas con respecto a los demás grupos que se comportaron de manera muy similar entre ellos a excepción de los valores a las 3 horas donde solo paracetamol y extracto crudo tuvieron valores bajos con respecto a los demás grupos donde se observó un incremento drástico en la concentración de IL-1β.

**Tabla 22.** Concentración de IL1- $\beta$  y comparación intragrupo.

Grupo	-18 (Basal)	0 (Febрил)	1	1.5	2	3
Solución salina	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	232.7 $\pm$ 35.65 *	168.3 $\pm$ 36.85 *	148.2 $\pm$ 35.34 *	192.0 $\pm$ 62.80 *
Paracetamol	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	43.26 $\pm$ 12.48	13.09 $\pm$ 6.00	12.54 $\pm$ 2.94	20.20 $\pm$ 10.24
Nimesulida	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	3.81 $\pm$ 1.01	6.09 $\pm$ 3.40	16.90 $\pm$ 4.83	212.0 $\pm$ 24.96 *
Sham	25.19 $\pm$ 3.53	39.04 $\pm$ 11.92	6.45 $\pm$ 2.03	18.31 $\pm$ 2.21	6.57 $\pm$ 2.55	147.9 $\pm$ 27.12 *
Extracto crudo	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	3.92 $\pm$ 1.99	11.53 $\pm$ 3.69	4.59 $\pm$ 1.12	31.01 $\pm$ 15.72
Lectina HSL	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	20.43 $\pm$ 9.50	8.60 $\pm$ 3.26	15.49 $\pm$ 4.84	129.5 $\pm$ 32.60 *
HSL+Galactosa	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	529.1 $\pm$ 14.19 *	330.1 $\pm$ 86.30 *	637.5 $\pm$ 57.8 *	267.8 $\pm$ 90.73 *
Pigmentos	25.19 $\pm$ 3.53	83.55 $\pm$ 17.53 *	15.39 $\pm$ 10.53	6.70 $\pm$ 4.31	4.19 $\pm$ 2.09	84.37 $\pm$ 19.59

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la concentración de IL-1 $\beta$  (pg/ml) en los diferentes tiempos de cada grupo. ANOVA 2 vías intragrupo *post hoc* Dunnett \* $p < 0.05$  vs. Basal de cada grupo.



**Figura 20.** Concentración de IL-1 $\beta$  en cada grupo: Los datos representan la media  $\pm$  E.E. de la concentración de IL-1 $\beta$  en los diferentes tiempos de cada grupo.

Posteriormente se aplicó una ANOVA de 2 vías con ajuste *post hoc* de Tukey para comparar entre si cada tiempo de los diferentes grupos. Como se puede observar en la tabla 23 existe diferencia significativa entre las concentraciones de solución salina en los tiempos 1, 1.5 y 2 horas respecto del resto de los grupos; a las 3 horas se ve un incremento en la concentración de todos los grupos excepto el de paracetamol y extracto crudo que se mantuvieron bajos.

**Tabla 23.** ANOVA de 2 vías ajuste *post hoc* de Tukey de la concentración de IL-1 $\beta$  intergrupo.

Tiempo (horas)	Extracto crudo					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	***	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	**	Ns	**	Ns	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Lectina HSL					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	***	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Pigmentos					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Solución salina					
	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	****	****	****	****	****

1.5	**	**	**	***	***	*
2	*	Ns	**	**	*	*
3	***	Ns	Ns	**	Ns	Ns
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Paracetamol</b>					
	vs. Solución salina	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	***	***	*	Ns	Ns	Ns
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Nimesulida</b>					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	Ns	***	Ns	**	Ns	Ns
<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Sham</b>					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	****	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
3	Ns	*	Ns	Ns	Ns	Ns

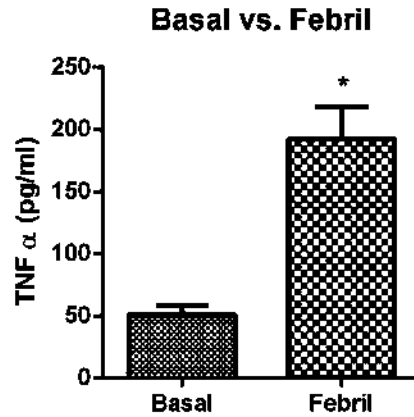
\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, Ns: No significativo

## Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$

Se agruparon los valores basales y febriles de todos los grupos excepto del grupo Sham para homogenizar los datos, los resultados se muestran en la tabla 24 y figura 21 donde se puede ver que es menor la concentración en el tiempo basal respecto del febril.

**Tabla 24.** Concentración basal y febril de TNF- $\alpha$

Concentración de TNF- $\alpha$ (pg/ml)					
Basal				Media	Error Estándar
37.96	120.69	10.08	146.14	51.32	7.32
18.90	8.25	102.70	14.93		
0.00	57.90	45.38	79.20		
16.47	109.21	64.03	29.14		
12.06	14.19	151.66	111.45		
3.69	19.74	42.82	104.84		
0.00	18.90	46.68	57.90		
26.13	48.01	57.90	-----		
0.00	3.27	107.01	-----		
48.01	42.82	120.69	-----		
Febril					
123.08	52.12	175.32	191.9	26.47	
154.48	92.43	130.45			
48.01	160.23	75.66			
151.66	476.95	140.77			
201.71	219.74	235.09			
92.43	401.14	138.14			
613.17	223.50	205.22			
305.86	157.33	27.12			
194.84	255.52	524.03			
14.93	98.50	67.23			



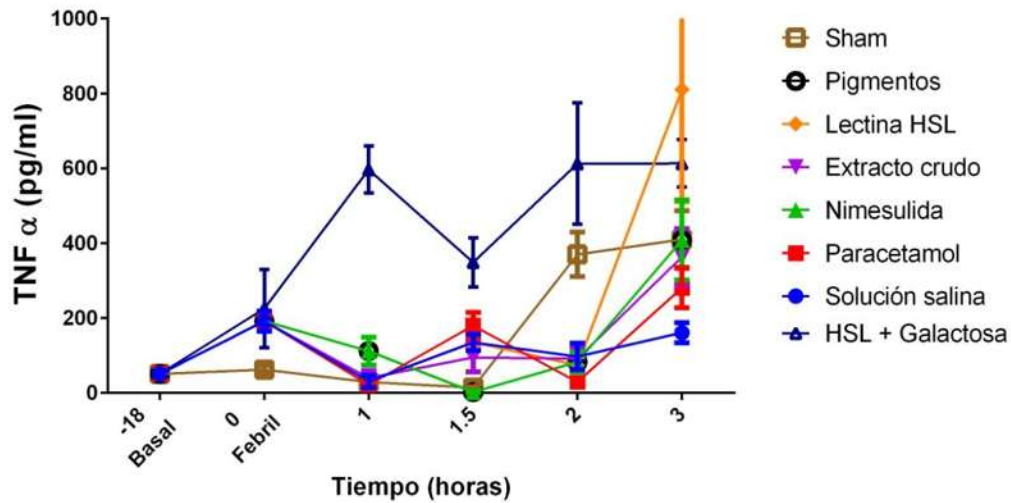
**Figura 21. Concentración basal vs febril de IL-1 $\beta$ :** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba t, \* $p < 0.05$  basal vs. febril.

En la tabla 25 y figura 22 se muestra la media de la concentración  $\pm$  error estándar del resto de los tiempos de cada grupo, en donde al hacer una comparación intragrupo de la concentración en los diferentes tiempos contra el valor basal se observa diferencia significativa en el tiempo 0 (febril) de todos los grupos a excepción del grupo Sham, donde la diferencia se aprecia a las 2 y 3 horas, por último también se observa diferencia a las 3 horas en todos los grupos excepto el de solución salina.

**Tabla 25. Concentración de TNF- $\alpha$  y comparación intragrupo.**

Grupo	-18 h (Basal)	0 h (Febril)	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Solución salina	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	30.86 $\pm$ 16.67	134.9 $\pm$ 21.82	97.32 $\pm$ 35.33	161.3 $\pm$ 26.90
Paracetamol	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	21.83 $\pm$ 5.23	180.1 $\pm$ 34.91	29.35 $\pm$ 11.19	281.2 $\pm$ 53.75 *
Nimesulida	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	111.9 $\pm$ 37.00	2.32 $\pm$ 1.16	83.19 $\pm$ 27.50	408.5 $\pm$ 106.6 *
Sham	51.32 $\pm$ 7.32	62.63 $\pm$ 10.92	29.52 $\pm$ 7.12	14.32 $\pm$ 2.62	370.3 $\pm$ 59.30 *	410.0 $\pm$ 76.91 *
Extracto crudo	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	40.32 $\pm$ 19.84	94.85 $\pm$ 38.40	91.58 $\pm$ 29.17	363.2 $\pm$ 75.76 *
Lectina HSL	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	31.56 $\pm$ 10.96	136.2 $\pm$ 10.48	74.13 $\pm$ 23.50	810.7 $\pm$ 300.2 *
HSL+Galactosa	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	597.0 $\pm$ 63.28 *	349.1 $\pm$ 65.66 *	412.7 $\pm$ 32.1 *	613.3 $\pm$ 63.49 *
Pigmentos	51.32 $\pm$ 7.32	191.9 $\pm$ 26.47 *	111.9 $\pm$ 37.00	2.32 $\pm$ 1.16	83.19 $\pm$ 27.50	408.5 $\pm$ 106.6 *

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la concentración de TNF- $\alpha$  (pg/ml) en los diferentes tiempos de cada grupo. ANOVA 2 vías intragrupo *post hoc* Dunnett \* $p < 0.05$  vs. basal de cada grupo.



**Figura 22. Concentración de TNF- $\alpha$  en cada grupo:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. de la concentración de TNF- $\alpha$  en los diferentes tiempos de cada grupo.

Se aplicó una ANOVA de 2 vías con ajuste *post hoc* de Tukey para comparar entre si cada tiempo de los diferentes grupos. Como se puede observar en la tabla 26 existe diferencia significativa hasta las 2 horas de administrado el tratamiento donde el grupo Sham presentó una alta concentración respecto al resto de los grupos, a las 3 horas fue mayor la concentración del grupo de lectina HSL mientras que solución salina y paracetamol presentaron valores bajos con respecto al resto.



**Tabla 26.** ANOVA de 2 vías ajuste *post hoc* de Tukey de la concentración de TNF $\alpha$  intergrupo.

Tiempo (horas)	Extracto crudo					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	Ns	**	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	****	Ns
Tiempo (horas)	Lectina HSL					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	Ns	**	Ns	Ns
3	****	****	****	****	****	****
Tiempo (horas)	Pigmentos					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	Ns	*	Ns	Ns
3	*	Ns	Ns	Ns	Ns	****
Tiempo (horas)	Solución salina					
	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	**	Ns	Ns	Ns
3	Ns	*	**	Ns	****	*
Tiempo (horas)	Paracetamol					
	vs. Solución salina	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	****	Ns	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	****	Ns

Tiempo (horas)	Nimesulida					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns
3	*	Ns	Ns	Ns	****	Ns
Tiempo (horas)	Sham					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	**	****	*	**	**	*
3	**	Ns	Ns	Ns	****	Ns

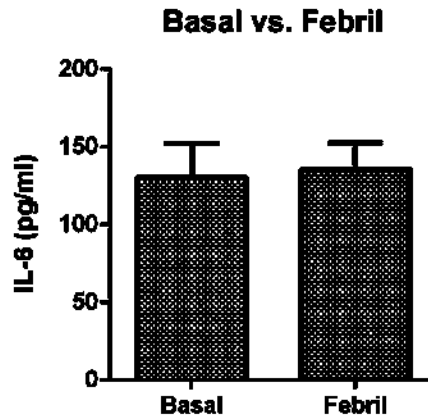
\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, Ns: No significativo

## Interleucina-6

Se agruparon los valores basales y febriles de todos los grupos excepto del grupo Sham para homogenizar los datos, los resultados se muestran en la tabla 27 y figura 23 donde se puede ver que tanto la concentración en el tiempo basal y el febril no son diferentes estadísticamente. Mientras que en la tabla 28 y figura 24 se muestra la media de la concentración  $\pm$  error estándar del resto de los tiempos de cada grupo, en donde al hacer una comparación intragrupo se observa que en cada grupo hay una elevación significativa de la concentración en diferentes tiempos, para solución salina es a las 1.5 h; paracetamol a 1.5 y 2 h; nimesulida a 1 h; sham a 2 y 3 h; extracto crudo a 1.5, 2 y 3 h; lectina HSL a 1.5 y 3 h; y pigmentos a 1 h.

**Tabla 27.** Concentración basal y febril de IL-6

Concentración de IL-6 (pg/ml)				
Basal			Media	Error Estándar
37.29	69.41	235.06	130.6	21.54
35.70	60.13	37.29		
28.34	106.44	211.43		
184.70	116.68	289.14		
29.73	29.73	304.23		
106.44	228.96	296.60		
353.84	156.31	44.14		
23.17	87.95	62.37		
Febril			Media	Error Estándar
312.04	64.66	165.35	135.4	17.21
205.85	47.83	24.41		
241.31	217.14	228.96		
147.65	87.95	57.95		
127.65	312.04	139.38		
113.19	131.47	151.93		
131.47	151.93	87.95		
53.75	18.61	28.34		

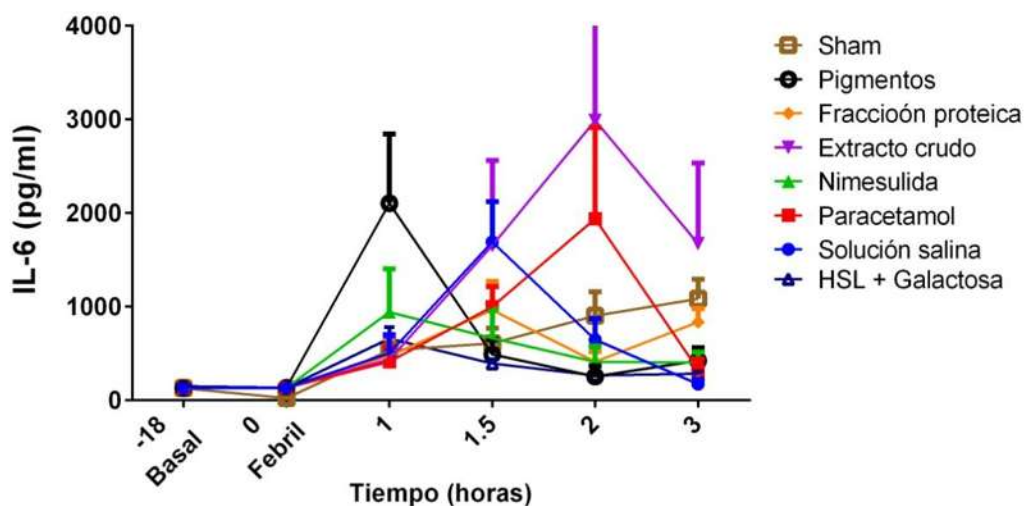


**Figura 23. Concentración basal vs febril de IL-6:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. Prueba t, \* $p < 0.05$  basal vs. febril.

**Tabla 28. Concentración de IL-6 y comparación intragrupo.**

Grupo	-18 h (Basal)	0 h (Febril)	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Solución salina	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	502.6 $\pm$ 201	1694 $\pm$ 430 *	649.3 $\pm$ 224.7	175.8 $\pm$ 48.80
Paracetamol	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	413.3 $\pm$ 158.7	1001 $\pm$ 214.8 *	1940 $\pm$ 974.8 *	329.8 $\pm$ 111.7
Nimesulida	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	944.1 $\pm$ 459 *	665.4 $\pm$ 302.4	414.2 $\pm$ 167	404.6 $\pm$ 111.2
Sham	130.6 $\pm$ 21.54	23.80 $\pm$ 3.16	535.8 $\pm$ 127.3	609 $\pm$ 160.9	903.8 $\pm$ 255 *	1085 $\pm$ 208 *
Extracto crudo	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	437.3 $\pm$ 245	1653 $\pm$ 908 *	2989 $\pm$ 1478 *	841.8 $\pm$ 281 *
Lectina HSL	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	472.3 $\pm$ 186.6	967.1 $\pm$ 303 *	413.3 $\pm$ 108.9	836.4 $\pm$ 143 *
HSL+Galactosa	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	661.6 $\pm$ 121 *	394.2 $\pm$ 43.7 *	267.5 $\pm$ 27.5 *	286.4 $\pm$ 22.3 *
Pigmentos	130.6 $\pm$ 21.54	135.4 $\pm$ 17.21	2106 $\pm$ 740.3 *	492.1 $\pm$ 158.2	256.5 $\pm$ 110.1	425.2 $\pm$ 139.2

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la concentración de IL-6 (pg/ml) en los diferentes tiempos de cada grupo. ANOVA 2 vías intragrupo *post hoc* Dunnett \* $p < 0.05$  vs. basal de cada grupo.



**Figura 24. Concentración de IL-6 en cada grupo:** Los datos representan la media  $\pm$  E.E. de la concentración de IL-6 en los diferentes tiempos de cada grupo.

Al aplicar una ANOVA de 2 vías con ajuste *post hoc* de Tukey para comparar entre si cada tiempo de los diferentes grupos se puede observar (tabla 29) que 1 hora después de administrado el tratamiento existe una concentración alta en el grupo de pigmentos y que es diferente con respecto al resto de los grupos; a la 1.5 horas la concentración de pigmentos disminuye drásticamente, mientras que se eleva en el grupo de solución salina siendo diferente estadísticamente con lectina HSL y pigmentos, en el extracto crudo también se eleva su concentración y esta es diferente con pigmentos y Sham; a las 2 horas el extracto crudo y paracetamol llegan a su pico máximo en concentración de IL-6 el cual es diferente estadísticamente al resto de los grupos; a las 3 horas existe todavía una concentración elevada en los grupos extracto crudo, lectina HSL y Sham, los cuales son diferentes estadísticamente con el resto de los grupos los cuales tienen valores más bajos.

**Tabla 29.** ANOVA de 2 vías ajuste *post hoc* de Tukey de la concentración de IL-6 intergrupo.

Tiempo (horas)	Extracto crudo					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	***
1.5	Ns	Ns	Ns	*	Ns	*
2	****	*	****	****	****	****
3	****	***	**	Ns	Ns	**
Tiempo (horas)	Lectina HSL					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	***
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	****	Ns	Ns	****	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Pigmentos					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	***	****	*	**	***	***
1.5	*	Ns	Ns	Ns	*	Ns
2	Ns	****	Ns	Ns	****	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	**	Ns
Tiempo (horas)	Solución salina					
	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	***
1.5	Ns	Ns	*	Ns	Ns	*
2	***	Ns	Ns	****	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	****	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Paracetamol					
	vs. Solución salina	vs. Nimesulida	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	****
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	***	****	**	*	****	****
3	Ns	Ns	Ns	***	Ns	Ns

Tiempo (horas)	Nimesulida					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Sham	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	*
1.5	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
2	Ns	****	Ns	****	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	**	Ns	Ns
Tiempo (horas)	Sham					
	vs. Solución salina	vs. Paracetamol	vs. Nimesulida	vs. Extracto crudo	vs. Lectina HSL	vs. Pigmentos
-18 (Basal)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
0 (Febril)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
1	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	**
1.5	*	Ns	Ns	*	Ns	Ns
2	Ns	**	Ns	****	Ns	Ns
3	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, Ns: No significativo

### Comparación entre IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6

Finalmente se analizaron las tres citocinas juntas por cada grupo para evaluar si existía una correlación entre su expresión. En el grupo de solución salina existe una mayor concentración de IL-6 respecto a IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los tiempos -18 (basal), 1, 1.5 y 2 horas, mientras que entre IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  solo existe diferencia a 1 hora de administrado el tratamiento siendo menor la expresión de TNF- $\alpha$  como se observa en la figura 25.

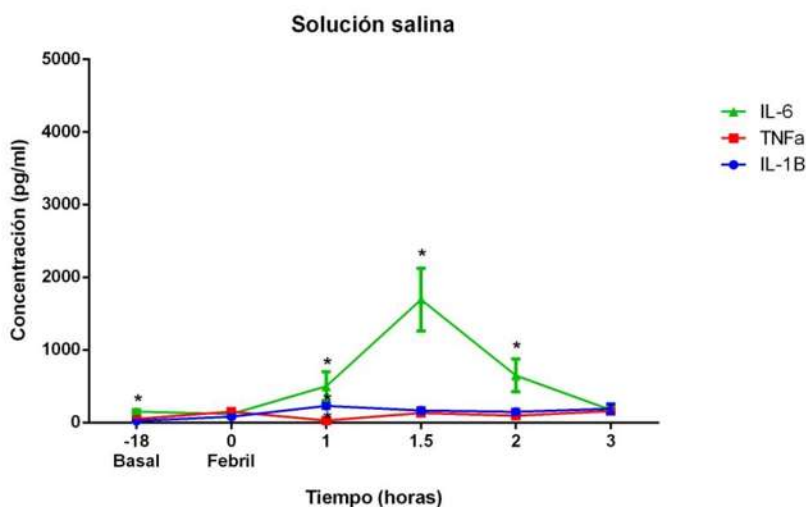
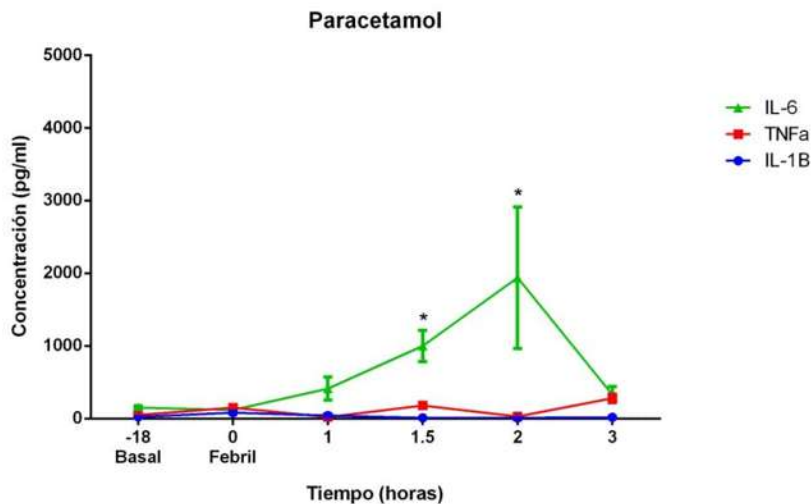


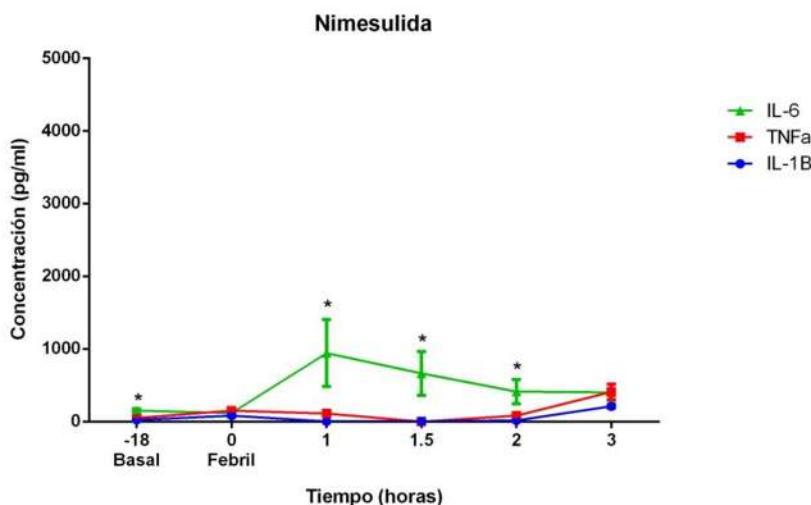
Figura 25. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Solución salina: Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

En el grupo de paracetamol solo se observó una mayor expresión en los tiempos 1.5 y 2 horas de IL-6 en comparación con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  siendo estas últimas iguales entre sí en todos los tiempos (figura 26).



**Figura 26. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Paracetamol:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

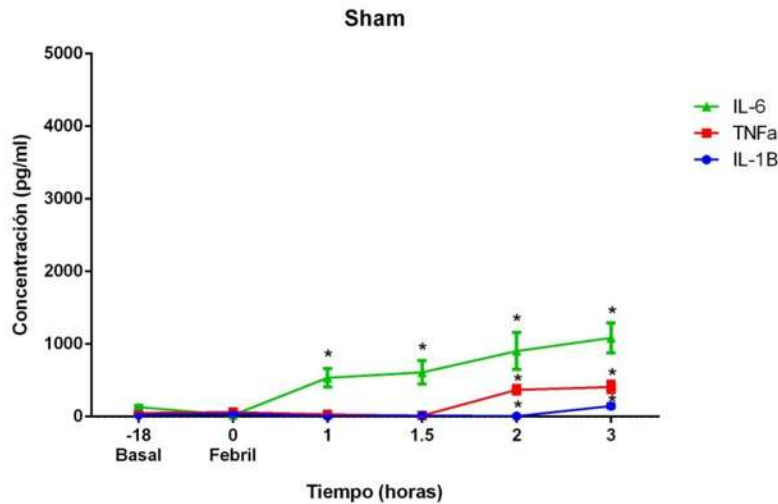
Para nimesulida IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se comportaron de forma muy similar sin haber diferencia significativa entre ellas, mientras que IL-6 mostró mayor expresión en los tiempos basal, 1, 1.5 y 2 horas (figura 27).



**Figura 27. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Nimesulida:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

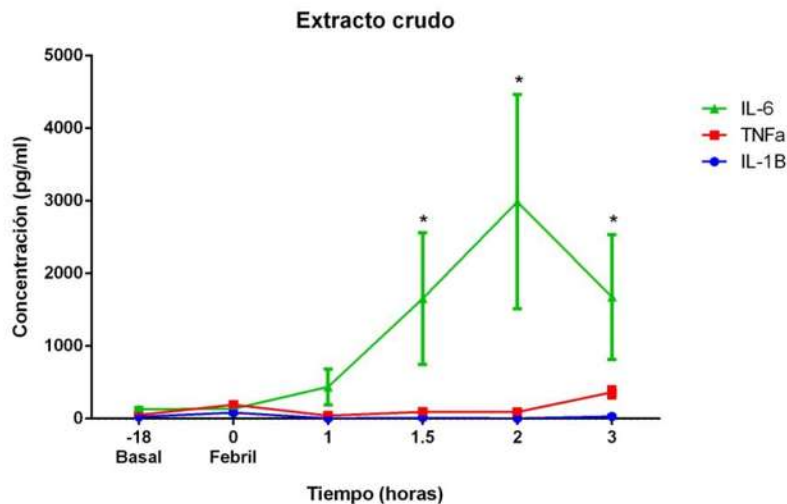


En el grupo Sham se puede apreciar una mayor expresión de IL-6 en los tiempos 1, 1.5, 2 y 3 horas respecto a las otras dos citocinas, en el tiempo 2 y 3 horas se mostró mayor expresión de TNF- $\alpha$  comparado con IL-1 $\beta$  (figura 28).



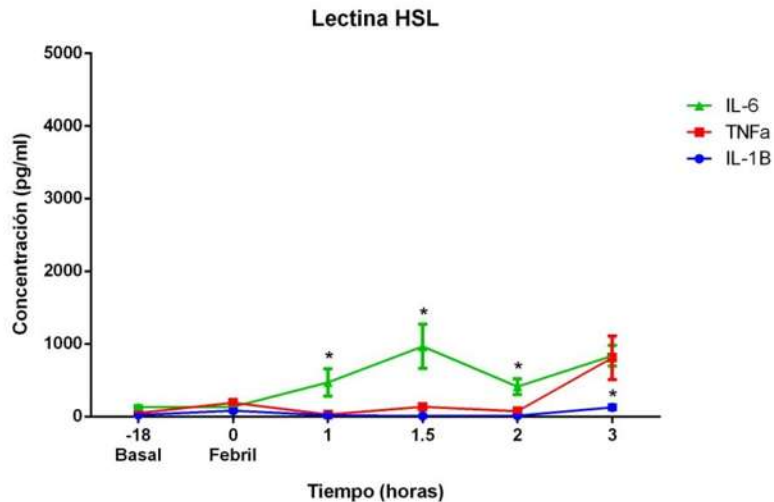
**Figura 28. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo Sham:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

Para extracto crudo IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se comportó de forma similar, e IL-6 mostró una elevada concentración en los tiempos 1.5, 2 y 3 horas respecto a las otras dos citocinas (figura 29).



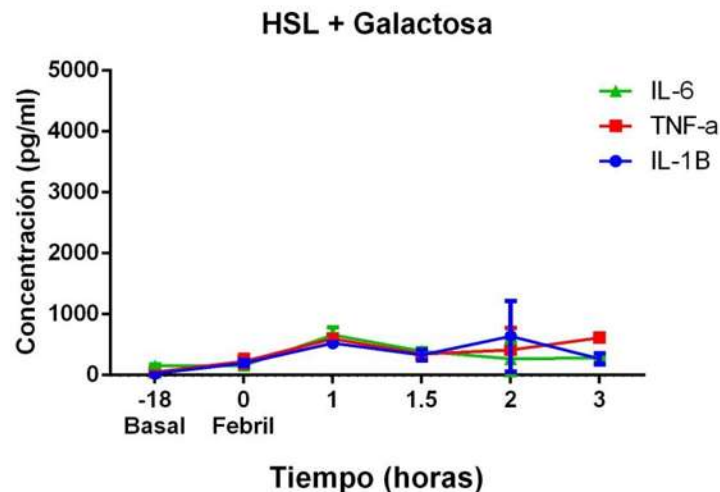
**Figura 29. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Extracto crudo:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

En el grupo de la lectina HSL se observó diferencia en IL-6 en los tiempos 1, 1.5 y 2 horas, mientras que IL-1 $\beta$  fue menor la concentración respecto a las otras dos citocinas en el tiempo 3 horas (figura 30).



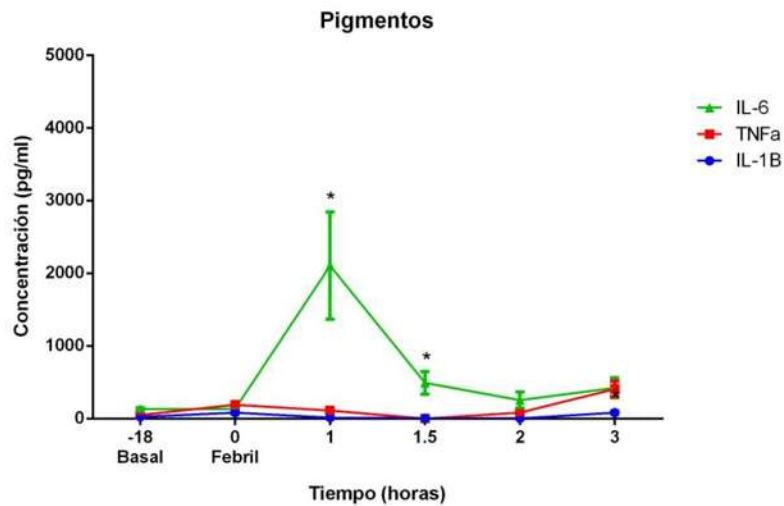
**Figura 30. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Lectina HSL:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

En el grupo de HSL + Galactosa el perfil de expresión entre las tres citocinas fue similar a excepción de a las 2 horas donde IL-6 estuvo por debajo de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , y esta última por encima de las otras dos a las 3 horas de administrado el tratamiento (Figura 31).



**Figura 31. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo HSL + Galactosa:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

Finalmente para los pigmentos solo fue mayor la expresión de IL-6 en los tiempos 1 y 1.5 horas, mientras que a las 3 horas la concentración de IL-1 $\beta$  fue menor respecto a las otras dos citocinas (figura 32).



**Figura 32. Correlación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo de Pigmentos:** Los datos representan la media de la concentración de cada citocinas (pg/ml). ANOVA dos vías *post hoc* Tukey, \*P<0.05.

## Prostaglandina E<sub>2</sub>

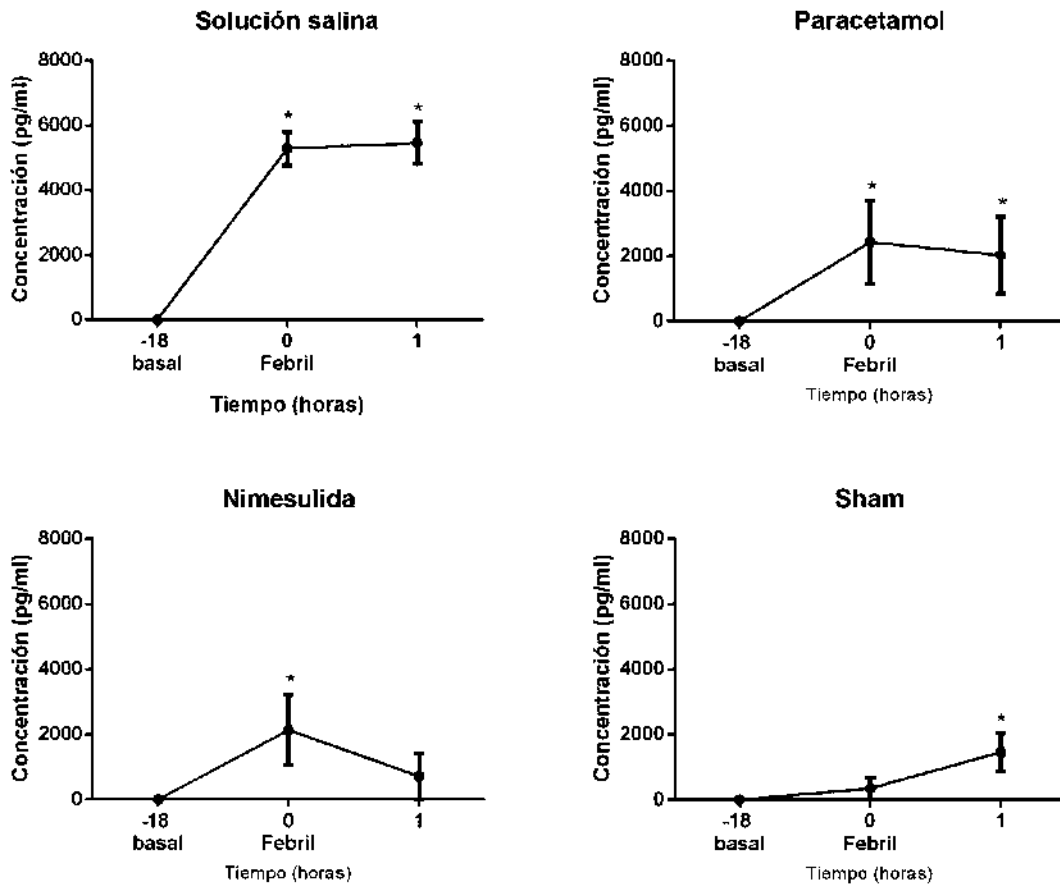
Se cuantificaron los niveles circulantes de prostaglandina E<sub>2</sub> en tres tiempos, basal, febril y una hora después de administrado el tratamiento. En la tabla 30 se muestran los datos obtenidos.

**Tabla 30.** Concentración de PGE<sub>2</sub> en cada grupo.

Grupo	-18 h (Basal)	0 h (Febril)	1 h
Solución salina	41,810 ± 1,206	47,096 ± 1,645	47,268 ± 1,842
Paracetamol	48,355 ± 1,907	50,785 ± 1,117	49,887 ± 677.3
Nimesulida	49,662 ± 326.3	51,694 ± 1,344	50,214 ± 650.5
Sham	50,945 ± 914.6	50,090 ± 2,616	53,093 ± 154.7
Extracto crudo	52,425 ± 1,137	52,321 ± 1,339	50,764 ± 551.9
HSL	48,685 ± 2,054	51,999 ± 432.7	52,121 ± 737.7
HSL + Galactosa	39,301 ± 2,812	34,907 ± 1,659	30,272 ± 413.9
Pigmentos	50,704 ± 309.7	51,546 ± 491.7	51,092 ± 202.0

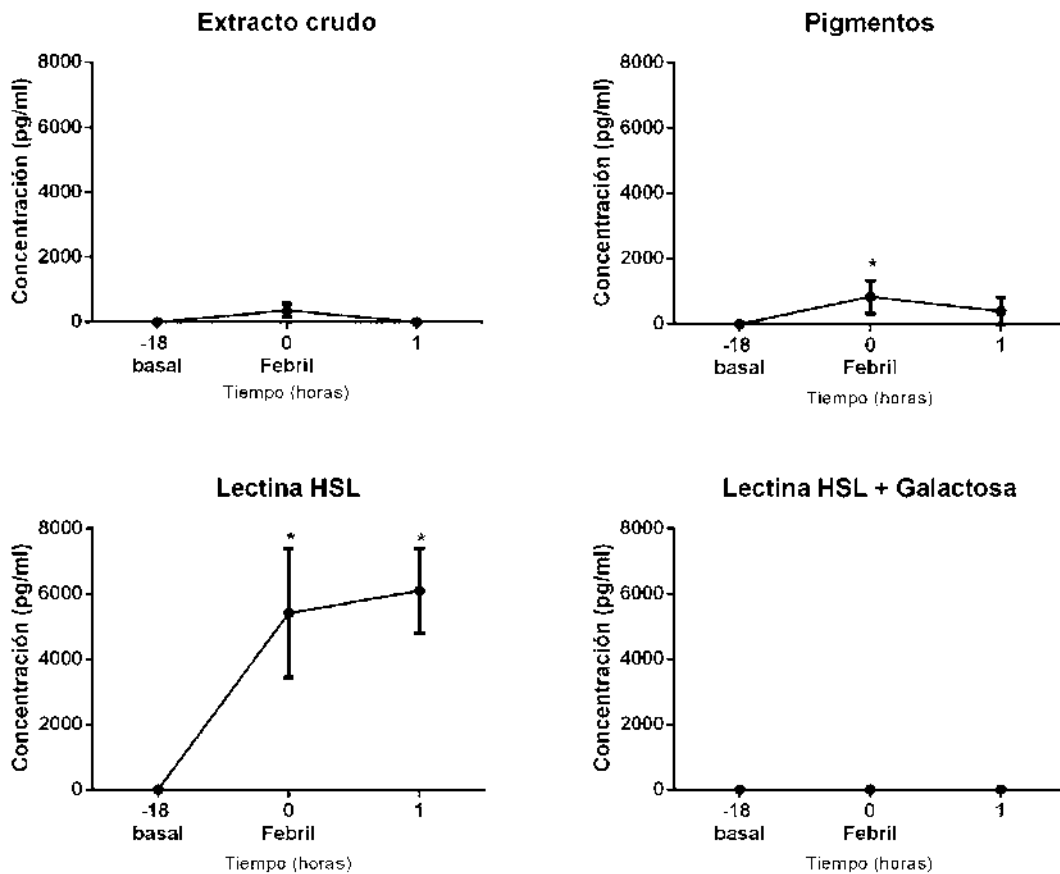
Los datos representan la media ± error estándar (pg/ml)

Para la elaboración de las gráficas los datos se representan como la diferencia entre los datos obtenidos y su correspondiente valor basal. En la figura 33 se muestran los cuatro grupos control donde podemos observar que para solución salina los niveles de PGE<sub>2</sub> se mantienen elevados en el tiempo febril y a una hora de administrado el tratamiento; paracetamol disminuye ligeramente del febril a 1 hora pero no resulta significativa la reducción; mientras que nimesulida si disminuye a la hora hasta ser similar a su valor basal; y finalmente para el grupo Sham se observa un incremento desde el tiempo 0 hasta la hora de iniciado el monitoreo.



**Figura 33. Concentración de PGE<sub>2</sub> en los grupos control:** Los datos representan la media de las diferencias  $\pm$  E.E. de la concentración de PGE<sub>2</sub>. ANOVA una vía post hoc Dunnett \*p<0.05

Mientras que en la figura 34 se representan los datos de los grupos experimental donde podemos observar que los valores basal y febril de extracto crudo son similares pero a la hora ocurre una reducción de la concentración aunque no es significativa; los pigmentos reducen la concentración a la hora con respecto a la concentración febril; la lectina HSL no reduce la concentración a la hora con respecto al valor febril; mientras que la lectina incubada con galactosa mostró una reducción significativa a la hora de administrada en comparación con su valor basal y febril.



**Figura 34. Concentración de PGE<sub>2</sub> en los grupos experimental:** Los datos representan la media de las diferencias  $\pm$  E.E. de la concentración de PGE<sub>2</sub>. ANOVA una vía post hoc Dunnett \*p<0.05

## VII. DISCUSIÓN

Cada vez son más las investigaciones que se realizan alrededor de los extractos obtenidos a partir de la flor de jamaica ya que se ha demostrado que poseen una serie de actividades farmacológicas, entre ellas una actividad antipirética como lo demostraron en modelos animales Reanmongkol e Itharat (2007), y Velázquez y Fenton (2010). Sabiendo que los extractos exhibían esta actividad antipirética surgió la incertidumbre de saber cuál sería el posible mecanismo por el cual estos extractos lograban quitar la fiebre, por ello el presente trabajo tiene como objetivo descubrir el mecanismo de acción de dichos extractos al evaluar las concentraciones circulantes de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub>, principales moléculas mediadoras de la respuesta febril (Conti, *et al.*, 2004), siendo este el primer reporte que establece el efecto de los extractos de flor de jamaica en la expresión de dichos pirógenos endógenos.

Como primer paso se obtuvieron tres diferentes extractos los cuales denominamos en un inicio extracto crudo, fracción proteica y pigmentos, en los tres se utilizó agua como solvente de extracción, ya que es la forma en que por tradición se elaboran las bebidas que consume la gente, aunado a ello Mungole y Chaturvedi (2011) compararon diversos solventes de extracción para los componentes de la flor de jamaica encontrando que tanto el agua como el alcohol resultaban ser los más efectivos para extraer fenoles, alcaloides, taninos y flavonoides. Por otro lado Al-Hashimi (2012) encontró que la extracción de fenoles de flores de jamaica con agua era de 72.22 mg/g mientras que con alcohol era de 87.7 mg/g, a pesar de que es mayor la extracción con alcohol no es mucha la diferencia respecto al agua. La importancia de obtener estos compuestos fenólicos es que se ha demostrado que son capaces de exhibir una amplia gama de efectos farmacológicos benéficos para la salud humana, entre los cuales esta su efecto antipirético (Mushtaq & Wani, 2013; Velázquez & Fenton, 2010).

También se sabe que el método utilizado para la extracción de proteínas con agua es eficaz ya que no altera la estructura, estabilidad y actividad biológica de las

proteínas presentes en la flor de jamaica (Martínez & Fenton, 2008). Las plantas pueden contener lectinas, proteínas que se unen a carbohidratos de forma específica y reversible, y que participan en numerosos procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos (Sharon & Lis, 2004).

Una vez que se elaboraron los tres extractos como se describió en la sección de material y métodos se procedió a su análisis, primero se evaluó la presencia de lectinas mediante ensayos de hemaglutinación siguiendo la metodología descrita por Debray y colaboradores (1981). El extracto crudo mostró actividad para los cuatro diferentes grupos sanguíneos humanos, en el caso de la actividad específica se pudo observar que estas lectinas mostraron mayor afinidad para el grupo sanguíneo A<sub>1</sub> seguida por B, O y A<sub>2</sub>. La hemaglutinación por parte de las lectinas presentes se debe a que reconocen los carbohidratos que están en la superficie de los eritrocitos de cada grupo sanguíneo humano dando como resultado la unión de muchas células y su posterior precipitación (Sharon & Lis, 2004). La actividad para los cuatro grupos sanguíneos en el extracto crudo se debe a que existe una mezcla de diferentes tipos de lectinas con distintas afinidades para carbohidratos.

De igual manera se evaluó la presencia de lectinas en la fracción proteica, donde se encontró que solo exhibía actividad para el grupo sanguíneo A<sub>1</sub>, esto quiere decir que solo había lectinas con afinidad para los carbohidratos presentes en los eritrocitos de dicho grupo sanguíneo. Esto se debe al método empleado para la extracción y concentración de proteínas, donde los diferentes pasos realizados fueron eliminando una serie de lectinas que estaban presentes en un inicio. Uno de estos pasos fue la precipitación con sulfato de amonio, la cual es una técnica que logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de sulfato de amonio agregado a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína-agua porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar ésta



propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas (Sánchez, 1998).

Para determinar el grado de heterogeneidad de la fracción proteica se realizó una electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata, se eligió teñirla con plata debido a que es un método más sensible que permite detectar concentraciones pequeñas de proteína de 2 a 5 ng (Carrillo, *et al.*, 2013). En el gel se puede apreciar la presencia de solamente una banda con un peso molecular aparente de 12,670 Da, esto nos demuestra junto con el ensayo de actividad hemaglutinante que contamos con una lectina a la cual denominamos Lectina HSL (*Hibiscus sabdariffa* Lectin).

Otro parámetro que se utiliza en una caracterización bioquímica es el desarrollo del isoelectroenfoco para determinar su punto isoeléctrico, en la HSL se observó solo una banda con un pI de 8.46. Esto coincide con reportes de muchas lectinas básicas purificadas de plantas (Varki, 2011). Una proteína tiene grupos cargados de ambas polaridades, por lo que presenta un punto isoeléctrico (pI) que corresponde al valor de pH al cuál la molécula posee carga neta (z) igual a cero (zwitterion), y por lo tanto es inmóvil en un campo eléctrico, esto es muy útil ya que la capacidad del IEF de separar las proteínas en bandas definidas lo hace útil como herramienta analítica y preparativa con un alto poder de resolución (Bjellqvist, *et al.*, 1982).

Para determinar la afinidad por carbohidratos que tiene la lectina encontrada se comparó la actividad inhibidora de varios carbohidratos en la hemaglutinación inducida por dicha lectina. El resultado fue que era específica en mayor grado para N-Acetilgalactosamina y en menor grado para galactosa y el resto de los carbohidratos, esto concuerda con la literatura ya que se sabe que los carbohidratos terminales de los eritrocitos del grupo sanguíneo A<sub>1</sub>, para el cual presenta actividad la lectina, son N-Acetilgalactosamina – Galactosa – Fucosa (Arbeláez-García, 2009).

El extracto de pigmentos que se utilizó fue analizado por Medrano y Fenton (2014) encontrando que contenía una concentración de  $217 \pm 23.51$  mg/ml de polifenoles y una concentración de  $7.12 \pm 0.23$  mg/ml de flavonoides. Estas concentraciones son altas ya que de acuerdo a Hussein y colaboradores (2010) la concentración de polifenoles que encontraron en extractos de jamaica oscilaba entre 21 y 32 mg/ml dependiendo del solvente y condiciones de temperatura utilizado; mientras que Mungole y Chaturvedi (2011) encontraron una concentración de flavonoides entre 0.23 y 0.75 mg/ml dependiendo de la parte de la planta de jamaica utilizada.

Una vez preparados los extractos de la flor de jamaica se cumplió con el primer objetivo del presente trabajo por lo que se prosiguió a trabajar con el modelo animal. Como era necesario tomar muestras repetidas de sangre se les realizó una cirugía a las ratas para insertarles un catéter en la vena yugular de forma permanente utilizando el método descrito por Peternel y col. (2010) y Thri vikraman y col. (2002), este método es una manera eficaz de obtener el volumen necesario de sangre y no comprometer la supervivencia del animal. En todo momento se siguió la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para montar el modelo de inducción de fiebre se utilizó el método descrito por García-González y colaboradores (2007) en el cual se utiliza una solución de *Saccharomyces cerevisiae* al 20%, la levadura tiene en su membrana celular la presencia de  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ -mananos los cuales pueden estimular la expresión de citocinas a través del receptor dectin-1, CR3 y TLR2, provocando así la cascada de señalización que induce la respuesta febril (Cross & Bancroft, 1995; Kikkert, *et al.*, 2007). La media del incremento de la temperatura 18 horas después de inyectar la levadura fue de  $1.17 \pm 0.13$  °C, de acuerdo a los reportes un incremento de 1°C es considerado fiebre por lo que aseguramos que el modelo fue exitoso y las ratas estaban en estado febril (García-González, *et al.*, 2007; Romanovsky, *et al.*, 2005; Roth & Souza, 2001).

Al contar con las ratas en un estado febril se procedió a la administración del tratamiento para ello se formaron 7 grupos, 3 de ellos nos ayudaron como control (solución salina, paracetamol y nimesulida) y los otros 4 para evaluar la actividad de los diferentes extractos (extracto crudo, lectina HSL, lectina HSL + Galactosa y pigmentos). Además de los grupos ya mencionados también se incluyó un grupo denominado Sham, el cual es un control que nos permite evaluar el comportamiento de la temperatura por la extracción de sangre, por el estrés generado en su manipulación, por cuestiones ambientales o por el propio ciclo circadiano, ya que es un grupo al que no se le induce fiebre ni administra tratamiento.

De acuerdo a lo observado en el grupo Sham podemos concluir que las condiciones ambientales y propias del modelo animal como la extracción de sangre y el estrés por manipulación, no producen una variación en la temperatura a lo largo del tiempo monitoreado que sea significativa con respecto a la temperatura basal de la rata.

El grupo de solución salina nos ayuda a evaluar el transcurso natural de la fiebre ya que el agua no tiene ningún efecto antipirético. Se puede observar que a 1.5 horas de administrada ocurre un descenso de la temperatura que es similar a la temperatura basal y posteriormente vuelve a elevarse a un estado febril, esto concuerda con el hecho de que hay reportes que indican que cuando se administra un pirógeno exógeno como el LPS se produce una fiebre polifásica que se caracteriza por dos o tres fases en las cuales ocurren picos y descensos de la temperatura, un primer pico entre 1-1.5 h, un segundo pico entre 2-2.5 h y un tercer pico entre 5-6 h; este comportamiento podría ser similar cuando la fiebre es ocasionada por la levadura, aunque en nuestro caso durante el tiempo de monitoreo solo se observó 2 fases (Romanovsky, *et al.*, 2005; Roth & Souza, 2001).

Los otros dos controles son paracetamol y nimesulida, se decidió usar estos dos fármacos para evaluar el efecto antipirético y compararlo con el efecto de los extractos, ya que nimesulida es un inhibidor selectivo de la COX-2, mientras que

paracetamol inhibe a las diferentes isoformas de COX con una mayor acción por COX-3, de ahí la importancia de haber incluido a los dos para tener más puntos de comparación con el posible mecanismo de acción de los extractos. Al observar su efecto antipirético observamos que ambos a partir de los 30 minutos quitan la fiebre, sin embargo con el paracetamol se observa una marcada hipotermia, esto es debido a que a diferencia de nimesulida, el paracetamol inhibe la actividad de la COX-3, enzima constitutiva de sistema nervioso central por lo que se promueve un descenso de los niveles de PGE<sub>2</sub> en el cerebro ocasionando que el punto de ajuste hipotalámico descienda drásticamente provocando así una respuesta fisiológica de pérdida de calor; mientras que con nimesulida solo se observa una ligera hipotermia a las 3 horas que se restableció en el siguiente tiempo monitoreado de 4 horas. (Harirforoosh, *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2008; Romanovsky, *et al.*, 2005; Shivaprakash, *et al.*, 2013).

De acuerdo a lo reportado se sabe que el paracetamol es capaz de producir hipotermia con dosis similares y menores a las utilizadas en este trabajo, por ejemplo Ayoub y colaboradores (2004) utilizaron dosis de 200 y 300 mg/kg demostrando que eran capaces de producir hipotermia en ratones, mientras que Li y colaboradores (2008) encontraron datos similares con una dosis de 160 mg/kg.

En cuanto a los extractos se probó un extracto crudo el cual contiene todos los componentes de la flor y se observó que ejercía su efecto antipirético a la 1.5 horas de ser administrado, Reanmongkol & Itharat (2007) encontraron datos similares a los obtenidos ya que ellos encontraron que a partir de las 2 horas disminuía la fiebre con un extracto acuoso de la flor de jamaica. Este efecto tan tardado puede deberse a que el extracto crudo contiene una diversidad muy amplia de componentes que podrían estar influyendo significativamente en el tránsito, pH y permeabilidad en el tracto gastrointestinal retardando así la absorción de los principios activos que regulan la fiebre (Charman, *et al.*, 1997).

Para saber específicamente cuál de todos los componentes de la flor es el que ejerce el efecto antipirético se probó con un extracto rico en pigmentos ya que se

sabe que los polifenoles pueden regular la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, así como también la de la enzima COX, lo que provoca la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Jiménez & Girbés, 2013). En el grupo tratado con estos pigmentos se encontró que quitaron la fiebre desde los 30 minutos, efecto similar al exhibido por los AINE con la ventaja de que no provocó hipotermia como el paracetamol. Este efecto tan rápido a comparación del extracto crudo es debido al poco tiempo que tarda en absorberse los pigmentos, se sabe que algunos pigmentos como la quercetina y algunos pigmentos glicosilados tardan de 0.5-0.7 horas en llegar a su máxima absorción, además de que algunos son capaces de resistir la hidrólisis acida en el estómago y llegar intactos al duodeno donde son absorbidos (Manach, *et al.*, 2004).

De igual manera se administró la lectina purificada para evaluar si ejercía una actividad antipirética, y se observó que la lectina HSL quitaba la fiebre 1 hora después de ser administrada manteniendo la temperatura en su valor basal hasta el final del tiempo monitoreado, con la ventaja de que no provoca hipotermia a diferencia del paracetamol. Para asegurarnos que era la lectina la que ejercía dicho efecto se le sometió a una incubación por 24 horas con galactosa, carbohidrato por el que tiene afinidad, y se administró a otro grupo de ratas encontrando que la fiebre no disminuía en ninguno de los tiempos monitoreados, manteniéndose febril, con esto podemos asegurar que la lectina HSL ejerce una actividad antipirética siendo este el primer reporte que comprueba la actividad antipirética de una lectina de *Hibiscus sabdariffa*.

Esta lectina podría estar interactuando con células M del intestino que presentan carbohidratos como N-Acetilgalactosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico en su membrana por lo que la lectina se adhiere a estos carbohidratos y se da un proceso de endocitosis, entrando de forma rápida a la célula y evitando la hidrólisis en el intestino para después atravesar la célula en forma de un endosoma y pasar a la circulación sistémica, proceso conocido como transcitosis (Gabor, *et al.*, 2004; Ramiro-Puig, *et al.*, 2008).

Evaluada la actividad antipirética de los extractos de flor de jamaica se cumplió con el segundo objetivo de la presente tesis por lo que se procedió a cuantificar los niveles circulantes de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6.

La levadura de cerveza contiene  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ -mananos en su membrana celular, estas moléculas son capaces de interactuar con los receptores dectin-1, CR3 y TLR2 de macrófagos provocando la activación y reclutamiento de una serie de proteínas de señalización como MyD88 e IRAK que en última instancia conducen a la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B responsable de la transcripción de citocinas proinflamatorias, esto explica el hecho de que encontramos una mayor expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  después de ser administrada la levadura en comparación con sus valores basales; sin embargo, en cuanto a la concentración de IL-6 se observó que los valores basales y febriles permanecían iguales. Según los reportes se ha encontrado que hay una co-estimulación entre estas tres citocinas, tanto IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  estimulan la expresión de IL-6 y esta a su vez es capaz de regular negativamente la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , esto podría ser la razón por la cual IL-6 aumenta hasta más avanzado el monitoreo entre 1 y 2 horas después de iniciada la fiebre ya que necesita ser estimulada por concentraciones altas de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Mackowiak, 1998; Municio, *et al.*, 2013; Netea, *et al.*, 2000; Roth & Souza, 2001).

Después de administrado el tratamiento se puede observar que disminuyen los niveles tanto de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en todos los grupos, a excepción de las ratas a las que se les dio solución salina y la lectina incubada con galactosa, esto es de esperar ya que en estos dos grupos la fiebre se mantuvo durante todo el ensayo. De acuerdo con algunos reportes se sabe de la actividad antiinflamatoria de nimesulida inhibiendo la expresión de citocinas proinflamatorias (Bennett, 1999), así como el paracetamol que se ha encontrado que es capaz de inhibir la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células de SNC (Tripathy & Grammas, 2009).

En cuanto a los extractos se observó que disminuían la concentración de ambas citocinas (con excepción de HSL+Gal) por lo que podríamos suponer que poseen

un efecto antiinflamatorio. Mientras que a las 3 horas se ve un aumento en todos los grupos, tanto para IL-1 $\beta$  como TNF- $\alpha$ , este aumento podría deberse a las fiebres polifásicas que se describen en modelos de inducción de fiebre, tratándose posiblemente de un aumento de citocinas que sin embargo no es suficiente como para provocar fiebre (Romanovsky, *et al.*, 2005; Roth & Souza, 2001).

Para explicar el por qué HSL-Gal no disminuye la fiebre ni la concentración de citocinas, se sabe que el anticuerpo IgG es capaz de ejercer una actividad tanto proinflamatoria como antiinflamatoria, este efecto depende de cuál sea el carbohidrato que se una a su dominio Fc, cuando es galactosa, el efecto que se desencadena es el proinflamatorio, esto concuerda con los niveles altos de citocinas encontrados en nuestro caso (Mehta, *et al.*, 2008).

Por otro lado IL-6 muestra perfiles de expresión muy similares entre los diferentes tratamientos, variando solo en el tiempo en que se muestra su máxima expresión entre 1 a 2 horas después de administrado el tratamiento. Se observó similitudes en cuanto al perfil de expresión entre nimesulida y la lectina HSL que lograron mantener valores más bajos de IL-6 que el resto de los grupos, se sabe que nimesulida es capaz de inhibir la expresión de esta citocina, un posible mecanismo es a través de la fosforilación y activación de receptores de glucocorticoides provocando cambios en la expresión de genes diana como el de IL-6, por lo que la lectina HSL podría estar ejerciendo un mecanismo similar (Bennett, 1999; Fahmi, *et al.*, 2001; Zanjani, *et al.*, 2010). Mientras tanto los grupos de Extracto crudo y Pigmentos son capaces de inhibir la expresión de IL-6 hasta 1.5 horas después de su administración, se sabe que algunos polifenoles tienen la capacidad de participar en la vía MAPK inhibiendo la acción de las proteínas JNK p54/p46 y ERK p44/p42, mientras que otros son capaces de inhibir la degradación del factor I $\kappa$ B evitando así la activación de NF- $\kappa$ B (Rasheed, *et al.*, 2009).

En cuanto a la cuantificación de prostaglandina E<sub>2</sub> se observó que el paracetamol no inhibió la concentración de PGE<sub>2</sub> debido a que poseen un débil efecto antiinflamatorio (Botting, 2000), efecto similar al que exhibió la lectina HSL, esto

nos hace suponer que la lectina puede estar teniendo un efecto dual, por un lado inhibiendo a la COX-3 como estudios demuestran que lo hace el paracetamol (Shivaprakash, *et al.*, 2013) o inhibiendo a IL-6 como lo hace nimesulida al interactuar con receptores de glucocorticoides (Bennett, 1999; Zanjani, *et al.*, 2010). Estudios con lectinas de otras plantas muestran que pueden poseer tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios, en el caso de los antiinflamatorios todo parece indicar que inhiben las citocinas proinflamatorias y la migración de neutrofilos, más no la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Liu, *et al.*, 2011; Pereira-da-Silva, *et al.*, 2012; Silva, *et al.*, 2010); mientras que Alencar (2010) encontró que la lectina que estudió era capaz de inhibir el efecto de PGE<sub>2</sub> en la formación de edema; por otro lado Gaidamashvili y van Staden (2006) encontraron que varias lectinas de plantas sudafricanas podían inhibir la actividad de COX-1 y COX-2.

Los grupos de nimesulida, extracto crudo y pigmentos disminuyeron la concentración de PGE<sub>2</sub>, se sabe que nimesulida es un inhibidor selectivo de COX-2 ya que compite con el sustrato de COX-2 uniéndose a su sitio activo, por lo que la disminución de PGE<sub>2</sub> era lo esperado (Cullen, *et al.*, 1998), al observar estos resultados podemos suponer que los pigmentos y el extracto crudo podrían estar actuando como un AINE ya que inhibieron la síntesis de PGE<sub>2</sub>.

En el grupo de solución salina se observó un incremento de PGE<sub>2</sub> en el tiempo febril y a 1 hora con respecto al valor basal ya que este grupo se mantenía con fiebre por lo que la síntesis de PGE<sub>2</sub> no disminuía, mientras que en el grupo Sham también hubo un aumento de la concentración pero no tan notorio como el de solución salina, esto se puede deber al estrés ocasionado al animal que no fue suficiente como para provocarle fiebre como se observó con la toma de temperatura.

Y finalmente el grupo al que se le administró la lectina incubada con galactosa se observó que los niveles de PGE<sub>2</sub> disminuyeron notoriamente con respecto a la basal mas no así los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, ni la fiebre. Reportes indican que la galactosa puede ocasionar daño oxidativo, inflamación, apoptosis mediada



por caspasas y un deterioro cognitivo. Esto podría explicar que a pesar de disminuir los niveles de  $PGE_2$ , existe un proceso inflamatorio ocasionado por la galactosa y los  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ - mananos de la levadura que la lectina no puede contrarrestar (Jeong, *et al.*, 2011).

Por todo lo anterior proponemos que el mecanismo de acción del extracto crudo de la jamaica es a través de la inhibición de  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$  y  $PGE_2$ ; el mecanismo de acción de los pigmentos de la jamaica es a través de la inhibición de  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$  y  $PGE_2$ ; y el mecanismo de acción de HSL es a través de la inhibición de  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$  e  $IL-6$ .

Los mecanismos antes propuestos quedan por ser corroborados mediante inmunohistoquímica.

## VIII. CONCLUSIONES

Se comprobó el efecto antipirético de los tres extractos de jamaica en ratas con fiebre inducida por levadura, con diferentes tiempos de acción: extracto crudo de jamaica 90 minutos, HSL 60 minutos y pigmentos de jamaica 30 minutos, con la ventaja de que no provocaron hipotermia como lo hizo paracetamol. Los tres extractos inhibieron la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma muy similar que los AINE. Por otro lado el extracto crudo y pigmentos disminuyeron los niveles circulantes de PGE<sub>2</sub>; mientras que HSL no modificó los niveles de PGE<sub>2</sub> circulantes.

El mecanismo de acción del extracto crudo de la jamaica es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>; el mecanismo de acción de los pigmentos de la jamaica es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub>; y el mecanismo de acción de HSL es a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6.

## IX. PERSPECTIVAS

- Determinar la secuencia de aminoácidos de la lectina HSL y determinar su estructura secundaria y terciaria.
- Realizar curvas dosis-respuesta de cada uno de los extractos para determinar su dosis efectiva media.
- Evaluar la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2 y COX-3 en el cerebro mediante inmunohistoquímicas para cada tratamiento.
- Cuantificar la concentración del mRNA de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2 y COX-3 en el cerebro mediante PCR en tiempo real para cada tratamiento.
- Cuantificar las concentraciones de PGE<sub>2</sub> en el cerebro mediante ELISA.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Malik, H., Akasaka, H. & Ruan, K.-H., 2013. Current advances of microsomal prostaglandin E synthase-1 as a target in inflammation and cancer. *The American Journal of Integrative Medicine*, 3(1), pp. 2-11.
- Agoreyo, F. O., Agoreyo, B. O. & Onuorah, M. N., 2008. Effect of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber Officinale* on blood cholesterol and glucose levels of rats. *African Journal of Biotechnology*, 7(21), pp. 3949-3951.
- Alarcón-Alonso, J. et al., 2011. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3), pp. 751-756.
- Alencar, N. M. et al., 2010. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflammation Research*, Volume 59, pp. 245-254.
- Al-Hashimi, A. G., 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), pp. 506-511.
- Ali, B. H., Wabel, N. A. & Blunden, G., 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research*, Volume 19, pp. 369-375.
- Alpizar, L. B. & Medina, E. E., 1999. Fisiopatología de la fiebre. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 28(1), pp. 49-54.
- Amin, A. & Hamza, A. A., 2006. Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 8(5), pp. 607-612.
- Anochie, P. I., 2013. Mechanisms of fever in humans. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*, 2(5), pp. 37-43.
- Apostolaki, M., Armaka, M., Victoratos, P. & Kollias, G., 2010. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *Current Directions in Autoimmunity*, Volume 11, pp. 1-26.
- Arbeláez-García, C. A., 2009. Sistema de grupos sanguíneos ABO. *Medicina y Laboratorio*, 15(7-8), pp. 329-347.

- Asif, M., 2014. Development of cyclooxygenases in the treatment of pain, fever and inflammation. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 2(1), pp. 17-22.
- Assier, E., Boissier, M. C. & Dayer, J. M., 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine*, Volume 77, pp. 532-536.
- Atkins, E., 1982. Fever: Its history, cause, and function. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, Volume 55, pp. 283-289.
- Ayoub, S. S. et al., 2004. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(30), p. 11165–11169.
- Ayroldi, E. et al., 2012. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *The FASEB Journal*, Volume 26, pp. 4805-4820.
- Babalola, S. O., Babalola, A. O. & Aworh, O. C., 2001. Compositional attributes of the calyces of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *The Journal of Food Technology in Africa*, 6(4), pp. 133-134.
- Banerjee, M. & Saxena, M., 2012. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta*, Volume 413, pp. 1163-1170.
- Barone, J. E., 2009. Fever: Fact and fiction. *The Journal of TRAUMA*, 67(2), pp. 406-409.
- Bennett, A., 1999. Overview of nimesulide. *Rheumatology*, 38(1), pp. 1-3.
- Bjellqvist, B. et al., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 6(4), pp. 317-339.
- Blatteis, C. M., 2007. The onset of fever: New insights into its mechanism. *Progress in Brain Research*, Volume 162, pp. 3-14.
- Bolade, M. K., Oluwalana, I. B. & Ojo, O., 2009. Commercial practice of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage production: optimization of hot water extraction and sweetness level. *World Journal of Agriculture Sciences*, 5(1), pp. 126-131.

- Boraschi, D. et al., 2011. IL-37: A new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European Cytokine Network*, 22(3), pp. 127-147.
- Botting, R., 2000. Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3?. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 31, pp. S202-10.
- Boulant, J. A., 2000. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in the thermoregulation and fever. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 31, pp. S157-S161.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Volume 72, pp. 248-254.
- Buvanendran, A. et al., 2006. Upregulation of prostaglandin E<sub>2</sub> and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology*, 104(3), pp. 403-410.
- Carrillo, J. et al., 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*, 8(1), pp. 19-26.
- Casasbuenas, J., 1990. El síndrome pirético. *Revista Colombiana de Anestesiología*, Volume 18, pp. 319-331.
- Charman, W., Porter, C., Mithani, S. & Dressman, J., 1997. Physicochemical and Physiological Mechanisms for the Effects of Food on Drug Absorption: The Role of Lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), pp. 269-282.
- Chen, H. H. et al., 2005. Grey relational analysis of dried Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, Volume 29, pp. 228-245.
- Choi, D. C. et al., 2007. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *The Journal of Neuroscience*, 27(8), pp. 2025-2034.
- Chow, J. C. et al., 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 274, pp. 10689-10692.

- Chrousos, G. P., 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 332(20), pp. 1351-1362.
- Chung-Davidson, Y.-W., Li, K. & Li, W., 2013. Prostaglandins and neural functions: a review. *Advances in medicine and biology*, Volume 69, pp. 1-18.
- Cid-Ortega, S. & Guerrero-Beltrán, J. A., 2012. Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), pp. 47-63.
- Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C. & Bartfai, T., 2004. Cytokines and fever. *Frontiers in Bioscience*, Volume 9, pp. 1433-1449.
- Couto de Lima, T. R., Silvestre, G., Quintas de Medeiros, A. C. & Rufino, J. C., 2012. State of the art of anti-inflammatory drugs. In: F. Badria, ed. *Pharmacotherapy*. s.l.:InTech, pp. 115-140.
- Cross, C. E. & Bancroft, G. J., 1995. Ingestion of acapsular cryptococcus neoformans occurs via mannose and B-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infection and Immunity*, 63(7), pp. 2604-2611.
- Cullen, L., Kelly, L., Connor, S. & Fitzgerald, D., 1998. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition by Nimesulide in Man. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(2), pp. 578-582.
- Debray, H. et al., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-Glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry*, Volume 117, pp. 41-55.
- Duke, J. & Atchley, A. A., 1984. *Center of New Crops and Plants Products*. [Online] Available at: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Hibiscus\\_sabdariffa.html#Chemistry](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html#Chemistry) [Accessed 09 Mayo 2014].
- Esplugues, J. V. & López-Jaramillo, P., 1997. Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas. En: *Farmacología humana*. Barcelona: Masson, S.A., pp. 327-341.
- Essa, M. M. & Subramanian, P., 2006. *Hibiscus sabdariffa* affects ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(3), pp. 321-325.

- Fahmi, H. et al., 2001. Nimesulide reduces interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 gene expression in human synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, Volume 9, pp. 332-340.
- Fonseca, J. E., Santos, M. J., Canhao, H. & Choy, E., 2009. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity Reviews*, Volume 8, pp. 538-542.
- Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G., 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, Volume 6, pp. 232-241.
- Gabor, F., Bogner, E., Weissenboeck, A. & Wirth, M., 2004. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volumen 56, pp. 459-480.
- Gadek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P. & Bugajski, J., 2013. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports*, Volume 65, pp. 1655-1662.
- Gaidamashvili, M. & van Staden, J., 2006. Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African medicinal plants. *South African Journal of Botany*, Volume 72, pp. 661-663.
- García-González, M., Escalante, C. & Díaz, C., 2007. 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*, 51(2), pp. 245-280.
- Ghosh, C. C. et al., 2010. Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I $\kappa$ B $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, Volume 185, pp. 3685-3693.
- Gosain, S. et al., 2010. Hypolipidemic effect of ethanolic extract from the leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. in hyperlipidemic rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 67(2), pp. 179-184.
- Haji-Faraji, M. & Haji-Tarkhani, A. H., 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 65, pp. 231-236.
- Harden, L. M. et al., 2011. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 $\beta$  and prostanoids in



mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology*, Volume 36, pp. 608-622.

- Harden, L. M. et al., 2013. Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *European Journal of Physiology*, pp. 1371-1374.
- Harirforoosh, S., Asghar, W. & Jamali, F., 2013. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 16(5), pp. 821-847.
- Hashizume, M. & Mihara, M., 2011. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hindawi Publishing Corporation, Arthritis*, pp. 1-8.
- Hasiwa, N. et al., 2013. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*, 30(2), pp. 169-208.
- Hussein, R., Shahein Y., El Hakim, A. & Awad, H., 2010. Biochemical and molecular characterization of three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of American Science*, 6(11), pp. 726-733.
- Hutchison, J. S. et al., 2008. Hypothermia therapy after traumatic brain injury in children. *The New England Journal of Medicine*, Volume 358, pp. 2447-2456.
- Idriss, H. T. & Naismith, J. H., 2000. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: structure-function relationships. *Microscopy research and technique*, Volume 50, pp. 184-195.
- Ismail, A., Khairul, E. H. & Mohd, H. S., 2008. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition, protein quality and health benefits. *Food-Global Science Books*, 2(1), pp. 1-16.
- IUPS Thermal Commission, 2001. Glossary of terms for thermal physiology. *The Japanese Journal of Physiology*, 51(2), pp. 245-280.
- Jakeman, K. J. et al., 1991. Nature of the endogenous pyrogen (EP) induced by influenza viruses: lack of correlation between EP levels and content of the known pyrogenic cytokines, interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor. *Journal of General Virology*, Volume 72, pp. 705-709.

- Jeong, K. et al., 2011. Ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi prevents oxidative damage and neuroinflammation and memorial impairments in artificial senescence mice. *Journal of Biomedical Science*, 18(14), pp. 1-12.
- Jiménez, P. & Girbés, T., 2013. Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo Folin-Ciocalteu. *Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*, pp. 1-11.
- Kikkert, R. y otros, 2007. Potentiation of toll-like receptor-induced cytokine production by (1→3)-β-D-glucans: implications for the monocyte activation test. *Journal of Endotoxin Research*, Volumen 13, pp. 140-149.
- Kracer, B. & Alduncin, N., 2005. Aspirina. Pros y contras. *Medicina Interna de México*, 21(5), pp. 355-367.
- Kushimoto, S. et al., 2014. Body temperature abnormalities in non-neurological critically ill patients: a review of the literature. *Journal of Intensive Care*, 2(14), pp. 1-6.
- Laddha, N. C., Dwivedi, M. & Begum, R., 2012. Increased tumor necrosis factor (TNF)-α and its promoter polymorphisms correlate with disease progression and higher susceptibility towards Vitiligo. *Plos One*, 7(12), p. e52298.
- Launey, Y., Nessler, N., Mallédant, Y. & Seguin, P., 2011. Clinical review: fever in septic ICU patients-friend or foe?. *Critical Care*, 15(222), pp. 1-7.
- Lazarus, M. et al., 2007. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nature Neuroscience*, 10(9), pp. 1131-1133.
- Leon, L. R., 2002. Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *Journal of Applied Physiology*, Volume 92, pp. 2648-2655.
- Li, S. et al., 2008. Acetaminophen: antipyretic or hypothermic in mice?. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 85(3-4), pp. 89-99.
- Liu, X. Q. et al., 2011. Purification of a Lectin from *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott and Its Pro-Inflammatory Effects. *Molecules*, Volume 16, pp. 9480-9494.
- Mackowiak, P. A., 1998. Concepts of fever. *Archives of Internal Medicine*, Volume 158, pp. 1870-1881.

- Mahadevan, N., Shivali & Kamboj, P., 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn.-An overview. *Natural Product Radiance*, 8(1), pp. 77-83.
- Malhotra, S. D., Rana, D. A. & Patel, V. J., 2013. Comparison of analgesic, anti-inflammatory and anti-pyretic efficacy of diclofenac, paracetamol and their combination in experimental animals. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 2(4), pp. 458-465.
- Manach, C., Scalbert, A. & Mora, C., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 79, pp. 727-747.
- Marquez-Vizcaino, R. L., De La Rosa-Torres, C., Agosto-Rivero, C. & Medina-Montes, M., 2007. Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. administrado en ratas albinas variedad wistar. *Scientia et Technica*, 13(33), pp. 377-381.
- Martínez, R. & Fenton, B., 2008. *Purificación y caracterización de lectinas en flores de jamaica Hibiscus sabdariffa L.*, Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Martins, J. S. et al., 2010. Diacerin decreases TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in peritoneal fluid and prevents baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflammation Research*, Volume 59, pp. 189-196.
- McKay, D. L., Chen, C.-Y. O., Saltzman, E. & Blumberg, J. B., 2010. *Hibiscus sabdariffa* L. Tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *The Journal of Nutrition*, 140(2), pp. 298-303.
- Mehta, A. S. et al., 2008. Increased levels of galactose-deficient anti-gal immunoglobulin G in the sera of hepatitis C virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis. *Journal of Virology*, 82(3), pp. 1259-1270.
- Mihara, M. et al., 2012. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, Volume 122, pp. 143-159.
- Moltó, A. & Olivé, A., 2010. Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications. *Joint Bone Spine*, Volume 77, pp. 102-107.
- Morton, D. B. et al., 1993. Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio. *Laboratory Animals*, Volume 27, pp. 1-22.

- Mozaffari-Khosravi, H. et al., 2009. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. *Journal of Human Hypertension*, Volume 23, pp. 48-54.
- Mozaffari-Khosravi, H., Jalali-Khanabadi, B.-A., Afkhami-Ardekani, M. & Fatehi, F., 2009. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(8), pp. 899-903.
- Mungole, A. & Chaturvedi, A., 2011. Hibiscus sabdariffa L. a rich source of secondary metabolites. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 6(1), pp. 83-87.
- Municio, C. et al., 2013. The response of human macrophages to  $\beta$ -glucans depends on the inflammatory milieu. *PLOS ONE*, 8(4), pp. 1-15.
- Mushtaq, M. & Wani, S. M., 2013. Polyphenols and human health-A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* , 4(2), pp. 338-360.
- Netea, M. G., Kullberg, B. J. & Van der Meer, J. W., 2000. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clinical Infection Diseases*, 31(5), pp. S178-S184.
- Niven, D. J. & Laupland, K. B., 2013. Pharmacotherapy of fever control among hospitalized adult patients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(6), pp. 735-745.
- Ojeda, D. et al., 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from Hibiscus sabdariffa. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 127, pp. 7-10.
- Onyenekwe, P. C., Ajani, E. O., Ameh, D. A. & Gamammiel, K. S., 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats.. *Cell Biochemistry and Function*, Volume 17, pp. 199-206.
- Ortiz-Márquez, S., 2008. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de jamaica cultivada en el estado Monagas. *Revista Voces: Tecnología y Pensamiento*, 3(1), pp. 61-75.
- Papadimitriou, A. & Priftis, K. N., 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, Volume 16, pp. 265-271.

- Parameswaran, N. & Patial, S., 2010. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), pp. 87-103.
- Pereira-da-Silva, G., Carvalho, F. C. & Roque-Barreira, M. C., 2012. Neutrophil Activation Induced by Plant Lectins: Modulation of Inflammatory Processes. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, Volume 11, pp. 433-441.
- Peternel, L., Skrajnar, S. & Cerne, M., 2010. A comparative study of four permanent cannulation procedures in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Volume 61, pp. 20-26.
- Pursell, E., 2011. Systemic review of studies comparing combined treatment with paracetamol and ibuprofen, with either drug alone. *Archives of Disease in Childhood*, pp. 1-5.
- Qi, Y. et al., 2005. Biological Characteristics, nutritional and medicinal value of Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *CIRCULAR-Urban Forestry Natural Resources and Environment*, Issue 604, pp. 1-2.
- Ramírez-Rodríguez, M. M. et al., 2011. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science*, 76(3), pp. C428-C435.
- Ramiro-Puig, E. et al., 2008. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), pp. 29-34.
- Rasheed, Z. et al., 2009. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAPkinase and NF- $\kappa$ B in human KU812 cells. *Journal of Inflammation*, 6(1), pp. 1-12.
- Reanmongkol, W. & Itharat, A., 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces in experimental animals. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(1), pp. 29-38.
- Romanovsky, A. A., 2006. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Volume 292, pp. 37-46.

- Romanovsky, A. A. et al., 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Frontiers in Bioscience*, Volume 10, pp. 2193-2216.
- Romanovsky, A. A., Steiner, A. A. & Matsumura, K., 2006. Cells that trigger fever. *Cell Cycle*, 5(19), pp. 2195-2197.
- Roth, J. & Souza, G. E., 2001. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Volume 34, pp. 301-314.
- Salleh, N., 2014. Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation. *The Scientific World Journal*, pp. 1-11.
- Sánchez, A., 1998. *Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por Candida rugosa.*, Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1813, pp. 878-888.
- Segura-Carretero, A. et al., 2008. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap). *Electrophoresis*, Volume 29, pp. 2852-2861.
- Sharon, N. & Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), pp. 53R-62R.
- Shivaprakash, G., Jagadish, R. P. & Pallavi, L. C., 2013. Unlocking the mystery of paracetamol mechanism of action and existence of cox-3 a review. *International Journal of Universal Pharmacy and Biosciences*, 2(6), pp. 317-325.
- Shivaprakash, G., Jagadish, R. P. & Pallavi, L. C., 2013. Unlocking the mystery of paracetamol mechanism of action and existence of COX-3 a review. *International Journal of Universal Pharmacy and Biosciences*, 2(6), pp. 317-325.
- Silva, L. et al., 2010. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), pp. 830-835.

- Smith, S. M. & Vale, W. W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, Volume 8, pp. 383-395.
- Souza, D. G. et al., 2003. IL-1 driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *The Journal of immunology*, Volume 170, pp. 4759-4766.
- Suleyman, H., Cadirci, E., Albayrak, A. & Halici, Z., 2008. Nimesulide is a Selective COX-2 Inhibitory, Atypical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *Current Medicinal Chemistry*, 15(3), pp. 278-283.
- Sullivan, J. E. & Farrar, H. C., 2011. Fever and Antipyretic use in children. *Official Journal of The American Academy of Pediatrics* , 127(3), pp. 580-587.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, Volume 21, pp. 335-376.
- Thriwikraman, K. V., Huot, R. L. & Plotsky, P. M., 2002. Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. *Brain Research Protocols*, Volume 10, pp. 84-94.
- Torpy, D. J. et al., 2000. Responses of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-6. *Arthritis and Rheumatism*, 43(4), pp. 872-880.
- Tran, T., Akasaka, H. & Ruan, K.-H., 2013. Current advances of prostaglandin E subtype receptors. *The American Journal of Integrative Medicine* , 3(1), pp. 23-30.
- Tripathy, D. & Grammas, P., 2009. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *Journal of Neuroinflammation*, 6(10), pp. 1-9.
- Tsigos, C. & Chrousos, G. P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, Volume 53, pp. 865-871.
- Tzu-Li, L. et al., 2007. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*, Volume 27, pp. 140-145.



- Udayasekhara, P., 1996. Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. *Plants Foods for Human Nutrition*, Volume 49, pp. 27-34.
- Usoh, I. F., Akpan, E. J., Etim, E. O. & Farombi, E. O., 2005. Antioxidant actions of dried flower extract of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite-induced oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(3), pp. 135-141.
- Velázquez, M. E. & Fenton, B., 2010. *Actividad antipirética de extractos crudos y proteicos de flor de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.)*, Morelia, Michoacán, México: s.n.
- Wang, D. et al., 2010. Structural insights into the assembly and activation of IL-1B with its receptors. *Nature Immunology*, 11(10), pp. 905-912.
- Yagoub, A. E. G. A., Mohammed, M. A. & Baker, A. A. A., 2008. Effect of soaking, sprouting and cooking on chemical composition, bioavailability of minerals and in vitro protein digestibility of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed. *Pakistan Journal of Nutrition* , 7(1), pp. 50-56.
- Yamamoto, M. et al., 2003. TRAM is specifically involved in the toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, pp. 1-7.
- Zafar, S. & Kehar, S. I., 2013. Cyclooxygenase-2 and cancer: a silent link with fatal ending. *International Journal of Pathology*, 11(1), pp. 32-38.
- Zanjani, T. M. et al., 2010. The attenuation of pain behaviour and serum interleukin-6 concentration by nimesulide in a rat model of neuropathic pain. *Scandinavian Journal of Pain* , Volume 1, pp. 229-234.
- Zetterstrom, M., Sundgren-Andersson, A. K., Ostlund, P. & Bartfai, T., 1998. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Annals New York Academy of Sciences*, pp. 48-52.
- Zhang, Y., Lin, J.-X. & Vilcek, J., 1990. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kB-like sequence. *Molecular and Cellular Biology*, 10(7), pp. 3818-3823.