Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 31: 218-225. (2019). https://doi.org/10.5281/zenodo.5542622
ISSN: 2343-6468 Digital / Depósito Legal ppi 198702SU4231 ISSN: 1315-0162 Impreso / Depósito Legal pp 198702SU187

EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE *Phytolacca icosandra* Y *Datura inoxia* SOBRE MACROFAGOS RAW 264.7

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *Phytolacca icosandra* AND *Datura inoxia* ON MACROPHAGES RAW 264.7

MIRIAN GARCÍA[1,2], PETER TAYLOR[2], IZASKUN URDANIBIA[2], MANUEL DA SILVA[1], MAYRA HERNÁNDEZ[3], JESICA JOHNSON[3]

[1]Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, Escuela de Bioanálisis, Maracay, Venezuela, [2]Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas-IVIC, Centro de Medicina Experimental, Laboratorio de Patología Celular y Molecular, Caracas, Venezuela,[3]Fundación Cruz Roja Venezolana, Laboratorio Clínico, Maracay, Venezuela
E-mail: mirianterezagarcia@gmail.com

RESUMEN

La inflamación es un mecanismo fisiológico de defensa que involucra factores solubles, cambios vasculares, activación y migración celular. Entre los mediadores inflamatorios se encuentran las prostaglandinas (PGs), las citocinas y el óxido nítrico (ON), entre otros. Sin embargo, el mismo proceso inflamatorio, que es efectivo en la eliminación del agente causal y en la remodelación del tejido, puede causar distintas patologías en humanos. Por ello, es necesario desarrollar drogas que inhiban de manera selectiva la inflamación, sin interferir con los beneficios de dicha respuesta. El uso de las plantas en la medicina tradicional sugiere la posibilidad de encontrar compuestos naturales con actividad anti-inflamatoria. Se evaluó el efecto anti-inflamatorio de los extractos *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS). Se determinó la viabilidad celular por sulforodamina B (SRB) así como el efecto inhibitorio sobre los mediadores ON por reacción de Griess y TNF-α e IL-6 (ELISA), y se realizó marcha fitoquímica para identificar los metabolitos secundarios. El extracto de *D. inoxia* mostró efecto inhibitorio sobre ON (70% a 30 µg/mL) sin efecto citotóxico (TGI > 100 µg/mL), mientras que el de *P. icosandra* no mostró efecto sobre ninguno de los mediadores. Los metabolitos secundarios presentes fueron alcaloides y terpenos para *D. inoxia*, y esteroles y alcaloides para *P. icosandra*. Se verificó el posible efecto anti-inflamatorio de *D. inoxia*.

PALABRAS CLAVE: Citocinas, óxido nítrico, macrófagos, extractos vegetales.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological defense mechanism that involves soluble factors, vascular changes, activation and migration of cells. Among the inflammatory mediators are prostaglandins (PGS), cytokines and nitric oxide (NO), among others. However, the same inflammatory process, that is effective in the elimination of the causative agent and in the remodeling of the tissue, can cause different pathologies in humans. Therefore, it is necessary to develop drugs that selectively inhibit inflammation, without interfering with the benefits of said response. The use of plants in traditional medicine suggests the possibility of finding natural compounds with anti-inflammatory activity. The anti-inflammatory effect of *Phytolacca icosandra* and *Datura inoxia* extracts on RAW 264.7 macrophages, stimulated with lipopolysaccharide (LPS), was evaluated. Cell viability was determined by sulforhodamine B (SRB), and the inhibitory effect on NO mediators by reaction of Griess and TNF-α and IL-6 (ELISA). Phytochemical monitoring was performed to identify secondary metabolites. *Datura inoxia* extract showed inhibitory effect on NO (70% at 30 µg/mL) without cytotoxic effect, whereas the extract of *P. icosandra* showed no effect on any of the mediators. The secondary metabolites present were alkaloids and terpenes from *D. inoxia*; sterols and alkaloids from *P. icosandra*. Possible anti-inflammatory effect of *D. inoxia* is verified.

KEY WORDS: Citokynes, nitric oxide, macrophages, plant extracts.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una reacción fisiológica de defensa caracterizada por calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función. El objetivo de la inflamación es eliminar el agente causal y las células dañadas, además de iniciar el proceso de reparación tisular, por lo que se considera que es un proceso beneficioso con sistemas de control que permiten su resolución una vez cumplida la función (Campos 2012). Sin embargo, la respuesta inflamatoria crónica como en la artritis reumatoide (AR), puede ser perjudicial (Calixto *et al*. 2004).

En la respuesta inflamatoria intervienen componentes vasculares y celulares como neutrófilos, linfocitos, macrófagos entre otros, los efectos sobre ambos componentes, están mediados por factores químicos producidos por la activación de las mismas células (Campos 2012).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleuquinas (IL-6, IL-1, IL-10) y el ON, juegan un papel central en el desarrollo de la

Recibido: junio 2018. Aprobado: enero 2019.
Versión final: febrero 2019.

inflamación, actúan como moléculas de defensa, regulatorias y con actividad homeostática (Haddad 2002). El ON, generado por la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en células como los macrófagos, destruye microorganismos, reacciona con radicales libres del oxígeno como el anión superóxido (O_2^-) generando peroxinitrito, un anión capaz de oxidar tioles y bases del ADN e iniciar la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Chen *et al*. 2008). La autooxidación del ON genera trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), un agente nitrosante asociado a transformaciones malignas y procesos inflamatorios (Kolios *et al*. 2004).

Las citocinas y sus receptores intervienen en las fisiopatologías inflamatorias, como sepsis y artritis, estos estados patológicos están relacionados con un desbalance de la red de citocinas y el reclutamiento excesivo de leucocitos al sitio de inflamación (Felmann *et al*. 1998, Haddad 2002). TNF-α participa en la reacción inflamatoria movilizando leucocitos, activando células endoteliales, incrementando la expresión de moléculas de adhesión celular e induciendo otros mediadores inflamatorios, es por ello que, una regulación anormal de la función del TNF-α juega un rol importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Mocellin *et al*. 2005).

IL-6 estimula la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda por los hepatocitos en procesos inflamatorios, traumas e infecciones (Oliveira *et al*. 2011). Se ha descrito el papel dual de la IL-6 ya que actúa como pro y anti-inflamatoria. Elevados niveles de IL-6 o su receptor soluble (sIL-6 R) se han relacionado con diversas enfermedades inflamatorias (Hirano *et al*. 1988). Así mismo, enfermedades neoplásicas han sido asociadas con altos niveles de IL-6 y proteínas de fase aguda, lo cual ha sido recíproco con la severidad de la enfermedad (Trikha *et al*. 2003).

Los productos naturales, incluidos los derivados de plantas, han contribuido al desarrollo de fármacos (Soto *et al*. 2000). Los constituyentes naturales de las plantas específicamente los metabolitos secundarios ejercen funciones en la defensa contra virus, hongos y plagas. Entre ellos se encuentran los flavonoides, alcaloides y terpenoides (Marcano y Hasegawa 2002), a los cuales se les ha demostrado efectos anti-inflamatorios (Saklani y Kutty 2008).

En Venezuela existen aproximadamente 20.000 especies de plantas de las cuales más de 1.500 son empleadas con fines medicinales por los indígenas y comunidades locales (Taylor *et al*. 2013). Una de estas plantas es *Phytolacca icosandra* (familia Phytolaccaceae), conocida comúnmente como jaboncillo o hierba del coyote, utilizada por su efecto analgésico y en el tratamiento del reumatismo (Martínez 1984). Para esta especie no existen reportes de trabajos *in vitro*, sin embargo, para la familia Phytolaccaceae se ha reportado efecto anti-inflamatorio y anti-oxidante en modelos *in vivo* (Abotsi *et al*. 2012).

Por otro lado, *Datura inoxia* (familia Solanacea) es conocida comúnmente como chamico, hierba verde o campana y es empleada para el tratamiento del reumatismo y dolor (Pan *et al*. 2007). El género *Datura* ha sido una importante fuente de alcaloides (Vermillion *et al*. 2011).

Históricamente, las plantas han sido útiles en el tratamiento de distintas enfermedades, esto ha servido como fuente para la investigación e identificación de sus principios activos y para el desarrollo de drogas de uso clínico. Debido a la gran variedad de enfermedades donde la inflamación juega un papel primordial, aun cuando existen drogas conocidas para su tratamiento, se requiere de nuevas alternativas que incrementen el arsenal terapéutico anti-inflamatorio. Es por ello que, en el presente trabajo se evaluó el efecto anti-inflamatorio de *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* mediado por la producción de ON, IL-6 y TNF-α en el sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los extractos de las plantas fueron seleccionados con base en el uso etnobotánico para el tratamiento de condiciones inflamatorias. Estos provienen de los estados Amazonas y Bolívar y forman parte de la colección del Dr. Fabian Michelangeli del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Preparación de los extractos

El material vegetal fue licuado y macerado en etanol al 95% durante 72 h, se filtró hasta la obtención del extracto alcohólico concentrado, el solvente fue eliminado, bajo presión reducida en un rotaevaporador y secado con bomba de vacío. El material vegetal seco, fue preparado en etanol al 50% como stock (100 mg/mL) a partir del cual se prepararon las concentraciones (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 y 100 µg/mL) empleadas en los ensayos.

Línea y cultivo celular

Macrófagos RAW 264.7, fueron cultivados y mantenidos en medio HAM-F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibióticos, piruvato y glutamina al 1% a 37°C en atmósfera húmeda 5% CO_2. La viabilidad celular se determinó por la técnica de sulforodamina B (SRB) (Houghton *et al*. 2007).

Determinación de citoquinas (IL-6 y TNF-α)

Las células (40.000 células/pozo) se cultivaron por 24 h, seguidamente fueron pre-incubadas por 1 h con las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos (0,1-100 µg/mL) disueltos en medio de cultivo, en los pozos controles se añadió solo medio específico (control basal) y dexametasona (50 µg/mL). Seguidamente, se estimularon con 2 µg/mL de LPS. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 h para la determinación de TNF-α e IL-6 por ELISA.

Determinación de óxido nítrico

La producción de nitritos en los sobrenadantes obtenidos a las 48 h se determinó por reacción de Griess (Green *et al*. 1982), para ello, 100 µL de los sobrenadantes se mezclaron con 100 µL del reactivo de Griess, se incubó por 10 min. La absorbancia se midió a 562 nm. La cantidad de nitritos se comparó con una curva de calibración de nitrito de sodio ($NaNO_2$). Se empleó como control aminoguanidina (50 µg/mL), inhibidor especifico de la iNOS (Griffiths *et al*. 1993).

Marcha fitoquímica

Para determinar los metabolitos secundarios, se realizaron pruebas químicas para conocer la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, polifenoles, terpenos, esteroles y saponinas (Marcano y Hasegawa 2002, Murillo y Méndez 2007).

Alcaloides: se determinó sobre el extracto etanólico llevado a sequedad y retomado con ácido clorhídrico (HCl), el filtrado se probó con los reactivos de reconocimiento: Meyer, Dragendorff y Wagner.

Flavonoides: se evaluó mediante la prueba de Shinoda. Para ello, al extracto disuelto en etanol se le agregó HCl y virutas de magnesio. La prueba se consideró positiva si se apreció cambio en la coloración.

Taninos y polifenoles: los fenoles se determinaron por la prueba del cloruro férrico para ello una cantidad del extracto disuelto en agua, se filtró y se le adiciono una solución de cloruro férrico al 1%. Si se observa una coloración parda indica presencia de fenoles.

La prueba de la gelatina-sal se empleó para la determinación de taninos. Para ello, la suspensión acuosa del extracto se trató con una solución de gelatina al 1% en cloruro de sodio al 1%. Un precipitado blanco leche indica la presencia de taninos.

Saponinas: se determinó mediante la prueba de la espuma.

Terpenos y/o esteroles: el extracto se disolvió en etanol y se le añadieron unas gotas del reactivo de Liebermann-Burchard. Un cambio en la coloración a violeta y tonalidades azules o verdes, simboliza la presencia de triterpenos y/o esteroles.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio aritmético más o menos la desviación estándar ($\overline{X} \pm$ D.E). La significancia estadística de la diferencia entre los promedios se examinó mediante la *t* de Student. Valores de *P* menores a 0,05 ($P < 0,05$) se consideraron significativos con respecto a los controles (Graphpad Instad, San Diego, USA).

RESULTADOS

La Figura 1 muestra los resultados de la viabilidad celular para los extractos *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia*, puede apreciarse que ninguno de los extractos afectó la viabilidad a la maxima concentración ensayada de 100 µg/mL.

Al determinar el efecto de los extractos sobre el mediador ON, puede apreciarse en la Figura 2 que *Phytolacca icosandra* no tuvo efecto inhibitorio sobre este mediador a la dosis máxima, sin embargo, el extracto *Datura inoxia* mostró efecto al disminuir la producción de ON, de forma dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo ($*P < 0,05$) a partir de 10 µg/mL, la inhibición fue de un 70% a 30 µg/mL. Para *Datura inoxia* el efecto observado a la dosis máxima fue comparable al del control aminoguanidina.

Al evaluar el efecto de los extractos *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* sobre las citoquinas IL-6 y TNF-α *in vitro*, los resultados ilustrados en las figuras 3 y 4, respectivamente, muestran que no hubo efecto inhibitorio sobre

dichos mediadores al comparar con el control de respuesta máxima (células tratadas solo con LPS).

Al determinar los metabolitos secundarios de cada uno de los extractos a través de diferentes pruebas fitoquímicas, se aprecia en la Tabla 1 que para el extracto *Datura inoxia* se demostró la presencia de alcaloides y terpenos, mientras que *Phytolacca icosandra* fue positiva para esteroles y alcaloides. Ambos extractos fueron negativos para saponinas, flavonoides, taninos y polifenoles.

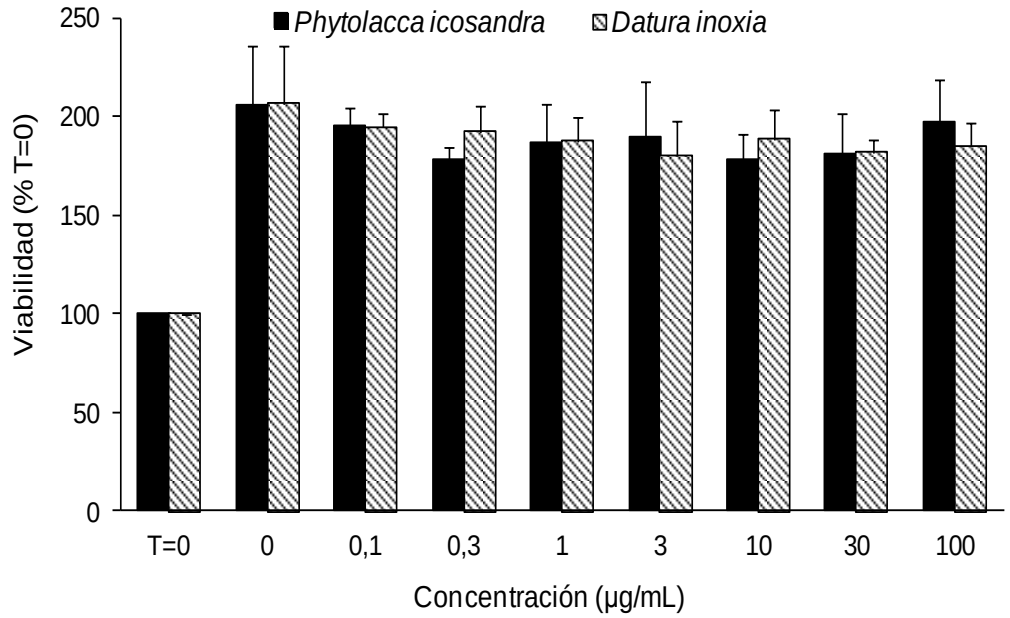


Figura 1. Efecto de *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* sobre la viabilidad celular. La viabilidad celular se determinó por la técnica de SRB. Resultados expresados como porcentaje de viabilidad al comparar con células sin tratamiento ($\overline{X}$ ± SD, n = 3).

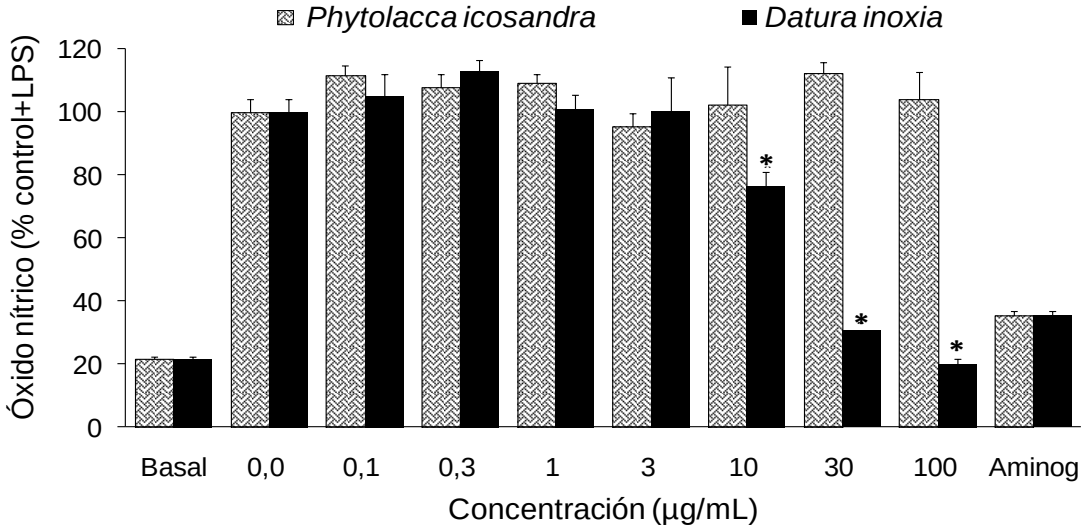


Figura 2. Efecto de *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* sobre ON *in vitro*. ON se determinó por reacción de Griess, en los sobrenadantes de 48 h. Resultados expresados como porcentaje del control (células con LPS). Aminog: aminoguanidina (50 µg/mL). $\overline{X}$ ± SD, n = 3 (* $P < 0,05$).

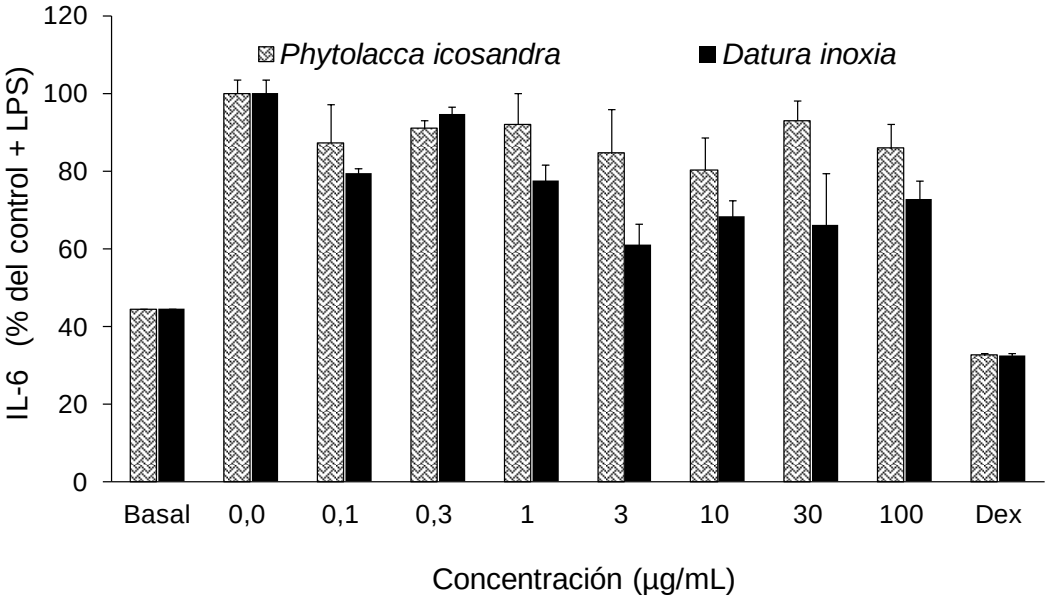


Figura 3. Efecto de *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* sobre IL-6 *in vitro*. IL-6 fue determinada por ELISA en los sobrenadantes de 24 h. Resultados expresados como porcentaje del control (células con LPS). Dex: dexametasona (50 µg/mL). $\bar{X}\pm$ SD, n = 3 ($P > 0,05$).

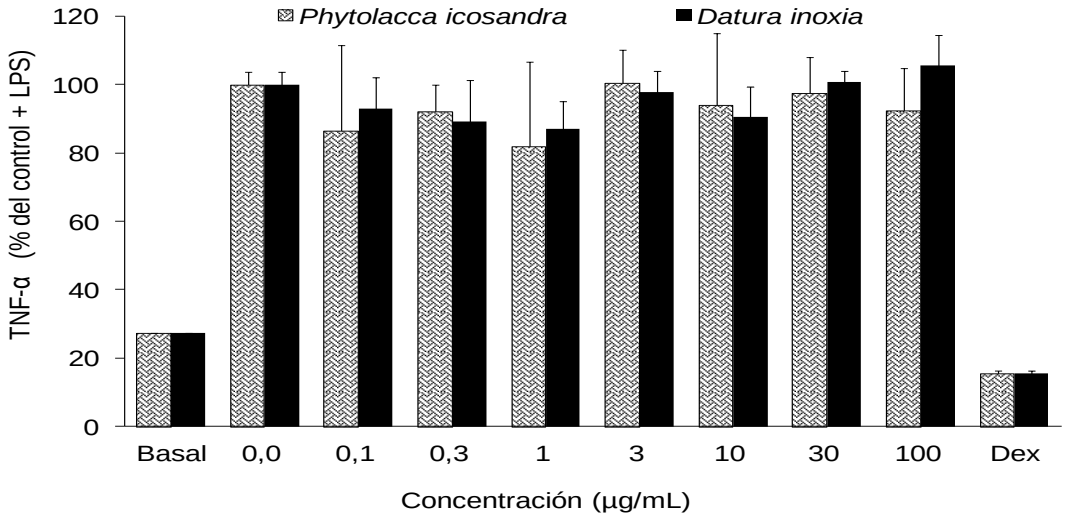


Figura 4. Efecto de *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* sobre TNF-α *in vitro*. TNF-α fue determinado por ELISA en los sobrenadantes de 24 h. Resultados expresados como porcentaje del control (células con LPS). Dex: dexametasona (50 µg/mL) $\bar{X} \pm$ SD, n = 3 ($P > 0,05$).

Tabla 1. Pruebas fitoquímicas para la determinación de metabolitos secundarios. Flavonoides, taninos, polifenoles, alcaloides, terpenos, esteroles y saponinas se determinaron por marcha fitoquímica. Resultados expresados como (+) presencia o (-) ausencia del metabolito.

Extractos	Flavonoides	Taninos y polifenoles	Alcaloides	Terpenos	Esteroles	Saponinas
Phytolacca icosandra	-	-	+	-	+	-
Datura inoxia	-	-	+	+	-	-

DISCUSIÓN

Se escogieron los extractos *Phytolacca icosandra* y *Datura inoxia* con la finalidad de validar su uso tradicional y su posible actividad anti-inflamatoria, por modular la producción de TNF-α, IL-6 y ON. Al determinar el efecto sobre la viabilidad celular se pudo observar que ningún

extracto mostró efecto citotóxico a la dosis máxima ensayada (100 µg/mL), esto permitió atribuir los efectos sobre los mediadores de inflamación a los metabolitos secundarios y no a efectos citotóxicos.

Algunos autores han establecido que el valor máximo de citotoxicidad para un extracto vegetal debería ser de un 50% (Hess *et al*. 1995), en este trabajo se consideró que un compuesto que afecte la viabilidad del 50% de las células sería poco efectivo, es por ello, que se consideraron como activamente citotóxicos aquellos extractos que mostraron un valor que excedió al 20%, para diferenciar un efecto verdaderamente anti-inflamatorio de uno citotóxico (Taylor *et al*. 2006). Con relación a esto Gertsch (2009) planteó que uno de los problemas de la etnofarmacología es precisamente, reportes de concentraciones muy altas para identificar una respuesta farmacológica, muchas de esas concentraciones se encuentran en el orden de mg/mL para ensayos *in vitro*, las cuales resultan inaceptables. Los resultados obtenidos para los extractos evaluados en este trabajo, permiten sugerirlos como candidatos promisorios para la búsqueda de compuestos con posibles efectos biológicos ya que no mostraron efecto citotóxico sobre la línea celular empleada.

Phytolacca icosandra no mostró efecto inhibitorio sobre los mediadores de inflamación determinados, para esta especie no existen reportes científicos de su efecto anti-inflamatorio *in vitro*. Sin embargo, para la familia Phytolaccaceae, Abotsi *et al*. (2012) reportaron efecto anti-inflamatorio en modelos de inflamación aguda y crónica *in vivo*, además de efecto anti-oxidante *in vitro*, los autores concluyen que este efecto es protector contra las lesiones de radicales libres y que contribuye en parte al efecto anti-inflamatorio observado.

Los metabolitos secundarios determinados para este extracto fueron positivos para alcaloides y esteroles. Sin embargo, Galarraga *et al*. (2014), evaluaron extractos metanólicos de las hojas y ramas de *Phytolacca icosandra* y aislaron dos triterpenos pentacíclicos y cinco saponinas triterpénicas identificadas como ácido espergulagénico, los cuales fueron estudiados por su actividad larvicida y repelente frente al mosquito vector del dengue. Para los metabolitos secundarios determinados en este extracto (alcaloides y esteroles) se han descrito efectos anti-inflamatorios, ejemplo de ello es el alcaloide conocido como colchicina establecido como agente para el tratamiento clínico de AR (Sais *et al*. 1995), este alcaloide es conocido por su acción preventiva contra otras enfermedades inflamatorias y trastornos del sistema inmune (Malkinson 1982). Sin embargo, se debe destacar que *Phytolacca icosandra* en el presente trabajo no mostró efecto inhibitorio sobre los mediadores de inflamación determinados, estas diferencias pueden ser atribuidas a la parte empleada de la planta y a la procedencia geográfica de la misma, ya que éstas son condiciones que afectan la concentración de dichos metabolitos, de igual manera se deben tomar en cuenta otros mediadores de inflamación que puedan ser evaluados.

Por su parte el extracto de *Datura inoxia* mostró efecto inhibitorio al disminuir la producción del mediador ON, el efecto observado para este extracto, fue a partir de 10 µg/mL, mostrando su mayor efecto a la concentración de 100 µg/mL. Estos resultados coinciden con los reportados por Blanco *et al*. (2013), quienes en un *screening* de la actividad anti-inflamatoria de plantas venezolanas, evaluaron la producción de ON *in vitro*, los autores reportaron esta misma especie entre los extractos más promisorios que inhibieron en un 50% la producción del mediador ON a concentraciones menores de 40 µg/mL, sin efecto citotóxico. Se puede inferir que, según lo reportado por otros autores y los resultados encontrados en esta investigación, la especie *Datura inoxia* pudiera ser de importancia para la búsqueda de compuestos con actividad anti-inflamatoria, específicamente, por su efecto sobre el mediador ON. Por otro lado, poco se ha reportado sobre el efecto anti-inflamatorio de *Datura inoxia*, recientemente, Fatima *et al*. (2017) reportaron actividad antioxidante para esta misma especie.

Con relación a los metabolitos secundarios de *Datura inoxia* se determinó la presencia de alcaloides y terpenos, con ausencia de saponinas, flavonoides, taninos/polifenoles. Para el género *Datura* se han reportado, entre sus metabolitos secundarios, flavonoides, fenoles, taninos y principalmente, alcaloides como sus constituyentes (Rajesh y Sharma 2002), de hecho la atropina que es un alcaloide natural es componente importante de la especie *Datura stramonium* (Bustamante y Morales 2003). Ayuba *et al*. (2011) realizaron un *screening* fitoquímico para *Datura inoxia* encontrando que entre los metabolitos secundarios de esta especie están atropina, saponinas, flavonoides, fenoles y ausencia de cumarinas y taninos. Los alcaloides y terpenos determinados en esta especie son compuestos con efectos sedativos y anestésicos y soportan la evidencia del uso tradicional de *Datura inoxia*. Con relación a los terpenos estos comprenden un grupo de compuestos a los cuales

se les han descrito propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes (Calixto *et al*. 2004, Quesada *et al*. 2011).

Los efectos anti-inflamatorios de algunas plantas se atribuyen a sus metabolitos secundarios, estos pueden interferir directa o indirectamente con mediadores inflamatorios (metabolitos del ácido araquidónico, citocinas), con las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) e iNOS (Hyun *et al*. 2004) o con mecanismos que modulan la expresión de factores de transcripción (AP-1, NF-kB) ya que algunos compuestos son capaces de inhibir la activación y unión de estos factores al ADN, con la consecuente inhibición de genes involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación (Mackenzie *et al*. 2004). Este pudiera ser uno de los posibles mecanismos de acción a través del cual se expliquen los efectos observados para el extracto *Datura inoxia*, por lo que se sugiere profundizar en este aspecto.

CONCLUSIÓN

El uso de plantas para el tratamiento de condiciones inflamatorias debe sustentarse científicamente. En el presente trabajo se demuestra que *Datura inoxia*, posee efecto anti-inflamatorio por inhibir ON, por ello se deben aislar e identificar los compuestos responsables de los efectos observados al emplear el extracto crudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTSI W, AINOOSON G, WOOD E. 2012. Anti-inflammatory and antioxidant effects of an ethanolic extract of the aerial parts of *Hilleria latifolia* (LAM) H. Walt. (Phytolaccaceae). Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. 9(1):138-152.

AYUBA V, OJOBE T, AYUBA S. 2011. Phytochemical and proximate composition of *Datura innoxia* leaf, seed, stem, pod and root. J. Med. Plants Res. 5(14):2952-2955.

BLANCO F, MICHELANGELI F, RUIZ M, FERNÁNDEZ A, GONTO R, FRAILE S, TAYLOR P. 2013. Screening of Venezuelan plants for anti-inflammatory activity. Results from an *in vitro* nitric oxide assay. Planta Med. 79:PF13.

BUSTAMANTE S, MORALES M. 2003. Farmacología de los antagonistas muscarínicos. Biblioteca Virtual Universal. Disponible en línea en: http:.//www.biblioteca.org.ar (Acceso 15.11.2017).

CALIXTO J, CAMPOS, OTUKI M, ADAIR R. 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin, Part II. Modulation of Pro-Inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med. 70(2):93-103.

CAMPOS G. 2012. Inflammation as an animal development phenomenon. Clin. Dev. Immunol. 2012:1-8.

CHEN K, PITTMAN R, POPEL A. 2008. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. Antioxid. Redox Signal. 10(7):1185-1198.

FATIMA I, HUSSAIN T, RAFAY M, AKRAM M, BANO S, SHABBIR S. 2017. Evaluation of antioxidant activity of leaves and fruits extracts of five medicinal plants. Pak. J. Pharm. Sci. 30(5):1625-1628.

FELMANN M, BRENAN F, MAINI R. 1998. Cytokines in autoimmune disorders. Int. Rev. Immunol. 17(1-4):217-228.

GALARRAGA E, AMARO J, ROJAS L, CLAIRE A, OFFER M, LACAILLE M. 2014. Triterpenos y saponinas triterpénicas de *Phytolacca icosandra* y *Phytolacca rugosa*. Ciencia (Universidad del Zulia). 22(1):53-66.

GERTSCH J. 2009. How scientific is the science in ethnopharmacology. Historical perspectives and epistemological problems. J. Ethnopharmacol. 122(2):177-183.

GREEN L, WAGNER D, GLOGOWSKI J, TANNENBAUM S. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluid. Anal. Biochem. 126(1):131-138.

GRIFFITHS M, MESSENT M, MACALLISTER R, EVANS T. 1993. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. Br. J. Pharmacol. 110(3):963-968.

HADDAD J. 2002. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun. 297(4):700-713.

HESS S, BRUM R, HONDA N, CRUZ A, MORETTO E, CRUZ R, MESSANA I, FERRARI F, YUNES R. 1995. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae).J. Ethnopharmacol. 47(2):97-100.

HIRANO T, MATSUDA T, TURNER M, MIYASAKA N, BUCHAN G, TANG B. 1988. Excessive production of interleukin 6/ B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. Eur. J. Immunol. 18(11):1797-1802.

HOUGHTON P, FANG R, TECHATANAWAT I, STEVENTON G, HAYLANDS P, LEE C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods. 42(4):377-387.

HYUN P, KUN H, HYEUN W, SAM S. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular Action mechanisms. J. Pharmacol. Sci. 96(3):229- 245.

KOLIOS G, VALATAS V, WARD S. 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. Immunology. 113(4):427-437.

MACKENZIE G, CARRASQUEDO F, DELFINO J, KEEN C, FRAGA C, OTEIZA P. 2004. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappa B activation at multiple steps in Jurkat T cells. FASEB J. 18(1):167-169.

MALKINSON F. 1982. Colchicine. New uses of an old, old drug. Arch. Dermatol. 118(7):453-457.

MARCANO D, HASEGAWA M. 2002. Fitoquímica orgánica. Editorial Torino, Caracas, Venezuela, pp. 29-59.

MARTÍNEZ J. 1984. Flora de Veracruz. Phytolaccaceae. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. 10:15-19.

MOCELLIN S, ROSSI R, PILLATI P, NITTI D. 2005. Tumor necrosis factor cancer and anticancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev. 16(1):35-53.

MURILLO E, MÉNDEZ J. 2007. Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios. Universidad de Tolima, Departamento de Química. Disponible en línea en; http://es.scribd.com/doc/276763755/Guia-Para-Deteccion-Rapidas-de-Algunos-Nucleos-Secundarios#scribd (Acceso 15.11.2017)

OLIVEIRA C, SAKATA R, MACHDO A, GEROLA L, SALOMÃO R. 2011. Cytokines and pain. Rev. Bras. Anestesiol. 61(2):255-259.

PAN Y, WANG X, HU X. 2007. Cytotoxic winthanolides from the flowers of *Datura metel*. J. Nat. Prod. 70(7):1127-1132.

QUESADA S, AZOFEIFA G, JATUNOV S, JIMÉNEZ G, NAVARRO L, GÓMEZ G. 2011. Carotenoids composition, antioxidant activity and glycemic index of two varieties of *Bactris gasipaes*. Emir. J. Food Agric. 23(6):482-489.

RAJESH G, SHARMA L. 2002. Studies on antimycotic properties of *Datura metel*. J. Ethnopharmacol. 80(2-3):193-197.

SAIS G, VIDALLER A, JUEGLA A, GALLARDO E. 1995. Colchicine in the treatment of cutaneous leukocytoclastic vasculitis results of a prospective, randomized controled trial. Arch. Dermatol. 131(12):1399-1402.

SAKLANI A, KUTTY S. 2008. Plant-derived compounds in clinical trials. Drug Discov. Today. 13(3-4):161-171.

SOTO M, SANJURJO M, GONZÁLEZ M, CRUZ D, GIRAL F. 2000. El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch). Potencial de su aprovechamiento en taxol. Ciencia Ergo Sum. 7(3):277-279.

TAYLOR P, CESARI I, ARSENAK M, BALLEN D, ABAD M, FERNÁNDEZ A, MILANO B, RUIZ M, WILLIAMS B, MICHELANGELI F. 2006. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. Pharm. Biol. 44(5):349-362.

TAYLOR P, ARSENAK M, ABAD M, FERNÁNDEZ A, RUIZ M, FRAILE S, TAYLOR S, MICHELANGELI F. 2013. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. Phytother. Res. 27(4):530-539.

TRIKHA M, CORRING R, KLEIN B, ROSSI J. 2003. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. Clin. Cancer Res. 9(13):4653-4665.

VERMILLION K, HOLGUIN O, BERHOW M, RICHINS R, REDHOUSE T, O'CONNELL M, POSAKONY J, MAHAJAN S, KELLY S, SIMON J. 2011. Dinoxin B, a withanolide from *Datura inoxia* leaves with specific cytotoxic activities. J. Nat. Prod. 74(2):267-271.