

Efectos del policosanol en los modelos de pleuresía inducida por carragenina y granuloma por algodón

Effects of policosanol on carrageenan-induced pleurisy and cotton pellet granuloma models

Dra. C. Daisy Carbajal Quintana Dra. C. Vivian Molina Cuevas, MSc. Yazmin Ravelo Calzado, Dr. C. Yohanis Pérez Guerra, MSc. Ambar Oyarzabal Yera, Dr. C. Rosa Mas Ferreiro

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el policosanol, mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores purificada de la cera de caña, inhibe la actividad de la cicloxigenasa-1 (COX-1) *in vitro*, efecto que pudiera sustentar su acción antiagregante plaquetaria. Sin embargo, sus posibles efectos en modelos experimentales de inflamación no se habían investigado.

Objetivo: determinar el efecto antiinflamatorio *in vivo* del policosanol en un modelo de inflamación aguda (pleuresía por carragenina) y crónico (granuloma por algodón).

Métodos: se distribuyeron las ratas Sprague Dawley en siete grupos para el modelo de inflamación aguda: un control negativo (vehículo) y seis a los que se les indujo la inflamación: un control positivo (vehículo), cuatro tratados con policosanol (50-800 mg/kg) y uno con aspirina (100 mg/kg). Se cuantificaron a las 5 h el volumen de exudado pleural, la concentración de proteínas y actividad de la enzima mieloperoxidasa. Se distribuyeron las ratas en seis grupos para el modelo crónico: un control (vehículo), cuatro tratados con policosanol (50-800 mg/kg) y uno con aspirina (100 mg/kg). Se extrajo el granuloma para determinar los pesos húmedo y seco seis días después de implantado el pellet.

Resultados: dosis orales únicas de policosanol (200, 400 y 800 mg/kg) redujeron significativa y moderadamente el volumen, la actividad de la enzima mieloperoxidasa ($\approx 12\%$) y la concentración de proteínas ($\approx 20\%$) del exudado pleural, mientras la aspirina redujo estos indicadores en un 35,3, 19,9 y 19,1%, respectivamente. La administración oral de policosanol (400 y 800 mg/kg) durante 6 días disminuyó significativa y moderadamente el peso húmedo del granuloma (16,4 y 16,2 %), y el peso seco (28,4 y 34,4 %). La aspirina 100 mg/kg redujo estas variables en un 18,5 %

(peso húmedo) y 34,4 % (peso seco). Ambos tratamientos produjeron mayores reducciones del peso seco que del peso húmedo del granuloma.

Conclusiones: la administración oral de policosanol produjo un moderado efecto antiinflamatorio *in vivo* en modelos de inflamación aguda y crónica.

Palabras clave: policosanol, granuloma, pleuresía, carragenina, mieloperoxidasa.

ABSTRACT

Introduction: policosanol, a mixture of higher aliphatic alcohols purified from sugarcane wax, inhibits cyclooxygenase-1 (COX-1) activity *in vitro*, an effect that could support its anti-platelet action. Its putative effects on experimental models of inflammation had not been yet investigated.

Objective: to determine the *in vivo* effect of policosanol on acute (carrageenan-induced pleurisy) and chronic inflammation (cotton-pellet granuloma) *in vivo* models.

Methods: in the acute model, rats were randomly distributed into seven groups: a negative vehicle control, and six with carrageenan-induced pleurisy: a positive control (vehicle), four treated with policosanol (50-800 mg/kg) and one with aspirin (100 mg/kg). Five hours later, volume of pleural exudate, protein concentration and myeloperoxidase activity were quantified. For the chronic model, rats were distributed into six groups: a control (vehicle), four treated with policosanol (50-800 mg/kg) and one group with aspirin (100 mg/kg). The cotton pellet was implanted and six days after treatment, it was extracted to determine the dry and the wet weights.

Results: single oral doses of policosanol (200, 400 and 800 mg/kg) reduced significantly and moderately the volume ($\approx 20\%$), the myeloperoxidase activity ($\approx 12\%$) and the protein concentration ($\approx 20\%$) in pleural exudates, whereas aspirin 100 mg/kg decreased significantly these indicators by 35.3, 19.9 and 19.1 %, respectively. Oral administration of policosanol (400 and 800 mg/kg) for 6 days reduced significantly and moderately the wet (16.4 and 16.2 %, respectively) and dry (28.4 and 34.4 %, respectively) granuloma weights. Treatment with 100 mg/kg aspirin reduced these variables by 18.5 % (wet weight) and 34.4 % (dry weight), respectively. Both treatments reduced the dry more than the wet granuloma weight.

Conclusion: oral administration of policosanol produced a moderate anti-inflammatory effect *in vivo* on models of acute and chronic inflammation.

Key words: policosanol, granuloma, pleurisy, carrageenan, myeloperoxidase.

INTRODUCCIÓN

Recientes han demostrado que el policosanol, mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores purificada de la cera de caña (*Saccharum officinarum* L.),¹ inhibe la actividad de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) *in vitro*.² Sin embargo, los posibles efectos del policosanol en modelos experimentales de inflamación no habían sido investigados.

El efecto hipolipemiante del policosanol y los mecanismos subyacentes han sido ampliamente estudiados; se ha demostrado que el policosanol inhibe la síntesis de

colesterol mediante una regulación de la actividad de la hidroximetilglutaril-coenzima reductasa (HMGCoA-reductasa) que implica la activación de la AMPK.³⁻⁵ Sin embargo, la reciente demostración de su efecto inhibitorio sobre la COX-1² no solo es la primera evidencia que pudiera sustentar su acción antiagregante plaquetaria, sino que de ella se deduce que el policosanol pudiera ejercer efectos antiinflamatorios *in vivo*, aspecto no investigado con anterioridad, y que pudiera constituir parte de sus efectos pleiotrópicos, al igual que sus efectos antiagregantes y antioxidantes.⁶⁻⁹ En tal sentido, es interesante destacar que se ha demostrado que el efecto antiaterosclerótico sobre el desarrollo de lesiones en monos se acompaña de la reducción de la migración de macrófagos en la pared arterial, efecto antiinflamatorio que puede contribuir a la estabilización de la placa aterosclerótica.¹⁰

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo ante diversos estímulos perjudiciales,¹¹ si bien la inflamación crónica puede inducir o agravar muchas enfermedades.^{12,13}

En particular, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria que se caracteriza por un conjunto de cambios que ocurren principalmente en la íntima arterial, acompañada de deposición de lípidos oxidados, elementos fibrosos y calcio en la pared arterial, con el consiguiente aumento del riesgo de sufrir enfermedades coronarias, cerebrovasculares y arteriales periféricas, principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes de edad media y avanzada.¹⁴

El impacto clínico de los inhibidores de la HMGCoA reductasa (estatinas), en la reducción del riesgo cardiovascular no solo se debe a sus efectos reductores sobre las cifras de colesterol transportado por lipoproteínas de abaja densidad (LDL-C), sino a sus efectos pleiotrópicos, dentro de los que se incluyen sus efectos antiinflamatorios.^{15,16}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, este estudio tiene el objetivo de determinar los efectos *in vivo* del policosanol en dos modelos experimentales de inflamación: la pleuresía inducida por carragenina (modelo de inflamación aguda)¹⁷ y el granuloma inducido por mota de algodón (modelo de inflamación crónica).^{18,19}

MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (200-250 g), provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio con libre acceso al agua y la comida (temperatura 20-25 °C, humedad relativa 60 ± 5 %, ciclos luz/oscuridad de 12 h). El alimento (pienso para roedores) y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

El estudio se condujo de acuerdo con las regulaciones vigentes sobre Buenas Prácticas de Laboratorio y con los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Centro de Productos Naturales (CPN).

Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 8:00 y 14:00 h en un local aislado de ruidos y temperatura controlada.

REACTIVOS

El policosanol, suministrado por las Plantas de Producción del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) (La Habana, Cuba), se utilizó en los experimentos tras corroborar sus especificaciones de calidad. La aspirina fue adquirida en QUIMEFA (La Habana, Cuba) y la carragenina (BDH, England).

Para su administración, el policosanol y la aspirina se prepararon en forma de suspensión en goma acacia (1 %) y la carragenina al 1 % en solución salina fisiológica.

MODELO DE PLEURESÍA POR CARRAGENINA

Las ratas se distribuyeron en siete grupos: un control negativo (vehículo) y seis grupos a los que se les indujo la inflamación mediante la inyección en la cavidad pleural de carragenina: un control positivo (vehículo), cuatro grupos tratados con policosanol (50, 200, 400 y 800 mg/kg) y un grupo de referencia con aspirina (100 mg/kg).

Los tratamientos (vehículo, policosanol o aspirina) se administraron 1 h previa a la inducción de la pleuresía por carragenina. Para ello, se anestesiaron los animales en atmósfera de éter, se les realizó una incisión en la zona dorso lateral y se les inyectó 0,3 mL de la disolución de carragenina (1 %) en la cavidad pleural; luego se sacrificaron 5 h después bajo anestesia. El exudado pleural se extrajo para cuantificar su volumen, concentración de proteínas y actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO).

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE EXUDADO PLEURAL (VE)

Para obtener el volumen de exudado pleural se añadió 1 mL de citrato de sodio (3,15 %) en la cavidad pleural, se homogenizó y se colectó en tubos plásticos graduados donde se midió su volumen (al que se le sustrajo el volumen de 1 mL de citrato añadido). Los exudados contaminados con sangre fueron desechados. El porcentaje de inhibición del edema se calculó como sigue:

$$\text{Inhibición} = 100 - (\Delta VE_T * 100) / (\Delta VE_C)$$

donde:

ΔVE_T = VE en los animales tratados - VE en los animales controles negativos

ΔVE_C = VE en los animales controles positivos - VE en los animales controles negativos

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA MIELOPEROXIDASA

La cuantificación de MPO en el exudado pleural se realizó según la técnica descrita en el Worthington enzyme manual.²⁰ Para ello, las muestras fueron sonicadas durante 10 s, se congelaron y descongelaron a una temperatura de -20 a 30 °C, por 3 veces sucesivas. Al culminar la última descongelación, las muestras se centrifugaron a 12 000 rm^{-1} por 25 min a 4 °C y se cuantificó la actividad MPO en el sobrenadante. Para ello, se mezclaron 250 μL de la muestra con 625 μL de solución amortiguadora fosfato (50 mM, pH= 6) (conteniendo 0,167 mg/mL de dihidrocloruro de O-dianisidina)

y 125 μ L de peróxido de hidrógeno (0,0005 %). Finalmente, durante los 2 min siguientes a la reacción en un espectrofotómetro se determinaron los cambios de absorbancia a 460 nm.

La actividad de la MPO se refirió como unidades (U)/mg de proteína en el exudado. Una U de MPO se define como la degradación de 1 μ mol de peróxido/min a 25 °C determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{U/mg de proteína} = \Delta A \text{ min} \times \text{Vol cubeta} / 8,3 \times \text{Vol muestra} \times 10$$

donde:

ΔA min: variación de la absorbancia

Vol cubeta: volumen final de la cubeta

Vol muestra: volumen de muestra añadido (μ L).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado.²¹

MODELO DE GRANULOMA POR MOTA DE ALGODÓN

Las ratas se distribuyeron en seis grupos: uno control tratado solo con el vehículo, cuatro tratados con policosanol (50, 200, 400 y 800 mg/kg) y uno de referencia con aspirina (100 mg/kg), todos administrados por vía oral durante 6 días.

Las ratas se anestesiaron previamente con tiopental sódico (30 mg/kg), se les realizó una incisión en la mitad dorso lateral colocando una mota de algodón estéril de un peso aproximado de 50 mg de peso y se suturó la herida aplicándose un antiséptico local. Seis días después de la implantación, las ratas se sacrificaron en atmósfera de éter y se extrajo el granuloma para la determinación de sus pesos húmedo y seco.²²

Los granulomas se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 h hasta alcanzar un peso constante, y se pesaron nuevamente en balanza analítica Sartorius. El peso de la mota de algodón (50 mg) se sustrajo del peso del granuloma. El porcentaje de inhibición se expresó tomando como referencia el peso del granuloma del grupo control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney. *A priori* se fijó un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete comercial Statistic para Windows (Release 4.2, Stat Soft, Inc USA).

RESULTADOS

La inyección intrapleural de carragenina aumentó significativamente el VE, la actividad MPO y la concentración de proteínas totales en los exudados pleurales con

respecto al los controles negativos, cambios que fueron reducidos por la administración oral de dosis únicas de policosanol (200, 400 y 800 mg/kg), la cual redujo significativa y moderadamente el VE ($\approx 20\%$), la actividad MPO ($\approx 12\%$) y la concentración de proteínas ($\approx 20\%$) en el exudado pleural, sin bien los efectos no resultaron dependientes de las dosis. La menor dosis ensayada (50 mg/kg) no fue efectiva (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del policosanol en el modelo de pleuresía por carragenina

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	VE (mL)	I (%)	MPO U/g tejido	I (%)	Proteínas $\mu\text{g/mL}$	I (%)
Control negativo	-	$0 \pm 0^{***}$	-	$1,96 \pm 3,32^{***}$	-	$1,65 \pm 1,72^{***}$	-
Control positivo	-	$1,3 \pm 0,35$	-	$52,27 \pm 5,84$	-	$22,93 \pm 3,28$	-
Policosanol	50	$1,22 \pm 0,22$	6,1	$50,58 \pm 4,69$	3,23	$22,76 \pm 3,02$	0,7
	200	$1,02 \pm 0,13^*$	21,5	$46,88 \pm 4,63^*$	10,3	$18,25 \pm 2,94^*$	20,4
	400	$1,00 \pm 0,18^*$	23,0	$46,13 \pm 3,73^*$	11,7	$18,01 \pm 3,58^*$	21,4
	800	$1,02 \pm 0,13^*$	21,5	$46,17 \pm 3,31^*$	11,6	$18,51 \pm 2,86^*$	19,2
Aspirina	100	$0,84 \pm 0,25^{**}$	35,3	$41,83 \pm 5,21^{**}$	19,9	$18,54 \pm 4,45^*$	19,1

I: Inhibición; VE: volumen de exudado; MPO: mieloperoxidasa.
 $^*p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$.

Comparación vs. control positivo (prueba de la U de Mann Whitney).

La administración oral de policosanol (400 y 800 mg/kg) durante 6 días disminuyó significativa y moderadamente el peso húmedo (16,4 y 16,2 %, respectivamente) y el seco (28,4 y 34,4 %, respectivamente) del granuloma con respecto al grupo control. La administración de aspirina 100 mg/kg redujo estas variables en un 18,5 % (peso húmedo) y 34,4 % (peso seco). Como se aprecia, ambos tratamientos produjeron mayores reducciones del peso seco que del peso húmedo del granuloma (tabla 2).

Tabla 2. Efecto del policosanol en el modelo de granuloma por algodón

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Peso húmedo (mg)	I (%)	Peso seco (mg)	I (%)
Control positivo	-	$1,018 \pm 0,19$	-	$0,2269 \pm 0,07$	-
Policosanol	50	$0,9992 \pm 0,17$	1,86	$0,1943 \pm 0,09$	14,3
	200	$0,9688 \pm 0,20$	4,8	$0,1785 \pm 0,03$	21,3
	400	$0,8502 \pm 0,06^*$	16,4	$0,1623 \pm 0,02^*$	28,4
	800	$0,8529 \pm 0,07^*$	16,2	$0,1488 \pm 0,02^{**}$	34,4
Aspirina	100	$0,8291 \pm 0,13^*$	18,5	$0,1482 \pm 0,04^*$	34,4

I: Inhibición.

$^*p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$. Comparación vs. control positivo (prueba de la U de Mann Whitney).

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el tratamiento oral con policosanol produjo efectos antiinflamatorios *in vivo* en los modelos de pleuresía por carragenina y granuloma por algodón.

La administración de policosanol (200-800 mg/kg) redujo significativamente todos los cambios inducidos por la carragenina tales como edema pleural, aumento de actividad MPO (enzima marcadora de la inflamación)²³ y de la concentración de proteínas en el exudado pleural. Por su parte, la aspirina (100 mg/kg), sustancia de referencia, produjo efectos similares, los cuales concuerdan con los esperados en este modelo y sustenta la validez de las condiciones experimentales.

La pleuresía inducida por carragenina es un modelo clásico de inflamación aguda *in vivo* muy utilizado para el estudio del efecto antiinflamatorio de numerosos compuestos. La inyección de carragenina en la cavidad pleural de roedores provoca una respuesta que involucra diferentes mediadores químicos presentes en el proceso inflamatorio como aminas vasoactivas, fragmentos de complementos, prostaglandinas (PGs) y citocinas (TNF- α y IL-1 β). Además este modelo se caracteriza por la infiltración de leucocitos polimorfonucleares, muy importantes en la patología del proceso inflamatorio.²⁴⁻²⁷

Por otra parte, la administración del policosanol (400 y 800 mg/kg) disminuyó significativamente los pesos húmedo y seco del granuloma, en el modelo de granuloma por algodón, modelo clásico empleado para el estudio de los componentes transudativos (edema) y de la fase proliferativa (tejido granulomatoso) del proceso inflamatorio crónico respectivamente,^{28,29} Como era de esperar, la administración de aspirina redujo tanto el peso húmedo como el peso seco del granuloma, lo que demuestra la validez de este modelo en las condiciones de trabajo de este estudio.

El hecho de que ambos tratamientos (policosanol y aspirina) hayan producido reducciones mayores del peso seco que del peso húmedo podría relacionarse con el hecho de que poseen un efecto mayor sobre la fase proliferativa inhibiendo la infiltración granulocítica posiblemente por prevenir la producción de fibras colágenas y suprimir los mucopolisacáridos.³⁰

La demostración de los efectos antiinflamatorios *in vivo* del policosanol observados en este trabajo, concuerda con su capacidad de inhibir la actividad de la COX-1 demostrada recientemente² dado el papel que esta enzima desempeña en este modelo.³¹

La magnitud de los efectos observados en ambos modelos, no obstante, debe calificarse de moderada, ya que los efectos máximos no alcanzaron inhibiciones del 50 % en ninguno de los indicadores. Si bien es cierto que sus efectos fueron comparables a los del tratamiento con aspirina 100 mg/kg, debe tenerse en cuenta que este estudio no fue comparativo, ya que no se investigaron los efectos de diferentes dosis de aspirina, por lo que no podemos afirmar que el efecto observado haya sido el máximo.

Estos resultados también son coherentes con los descritos recientemente por *Anderson* y otros,³² quienes encontraron que el octacosanol, principal componente del policosanol, extraído de las hojas de *Sabicea grises*, mostró un efecto antiinflamatorio en el modelo de pleuresía por carragenina, lo que disminuye significativamente el conteo de leucocitos y la entrada de neutrófilos mediante una inhibición de vías dependientes de citocinas pro-inflamatorias.

El hecho que el policosanol produzca efectos antiinflamatorios contribuye a la presencia de otros efectos que pudieran explicar su acción antiaterosclerótica demostrada en diferentes modelos experimentales.

No obstante, los resultados del presente trabajo estimulan a realizar estudios futuros que profundicen en los efectos antiinflamatorios del policosanol en diferentes modelos y sobre diferentes marcadores de la inflamación.

En conclusión, la administración oral de policosanol produjo un moderado efecto antiinflamatorio *in vivo* en modelos de inflamación aguda y crónica.

Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de Sonia Jiménez Despaigne y Maikel Añorga Noa y su contribución en la consecución de los resultados presentados en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mas R. Policosanol. *Drugs Future*. 2000;25(6):569-86.
2. Pérez Y, Mas R, Oyarzábal A, Jiménez S, Molina V. Effects of policosanol (sugar cane wax alcohols) and D-003 (sugarcane wax acids) on cyclooxygenase (COX) enzyme activity *in vitro*. *Curr Top Nutraceut Res*. 2012 (en prensa).
3. Menéndez R, Amor A, Rodeiro I, González RM, Acosta P, Alfonso J, et al. Policosanol modulates HMGCoA reductase activity in cultured fibroblasts. *Arch Med Res*. 2001;32:8-12.
4. Dev K, Singh LL, Todd D. Porter Policosanol Inhibits Cholesterol Synthesis in Hepatoma Cells by Activation of AMP-Kinase. *JPET*. 2006;318:1020-6.
5. Oliaro-Bosso S, Calcio Gaudino E, Mantegna S, Giraud E, Meda C, Viola F, et al. Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids*. 2009;44:907-16.
6. Arruzazabala ML, Molina V, Más R, Fernández L, Carbajal D, Valdés S, et al. Antiplatelet effects of policosanol 20 and 40 mg/d in healthy volunteers and dyslipidemic patients. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol* 2002;29(10):891-7.
7. Castaño G, Arruzazabala L, Fernández L, Mas R, Carbajal D, Molina V, ET al. Effects of combination treatment with policosanol and omega-3 fatty acids on platelet aggregation. A randomized double-blind clinical study. *Cur Therapeutic Res*. 2006;67(3):174-92.
8. Menéndez R, Más R, Amor A, Fernández JC, González RM. Effects of Policosanol on the low density lipoprotein (LDL) isolated on hypercholesterolemic patients at high coronary risk to *in vitro* copper-mediated lipid peroxidation. *Curr Ther Res*. 2000;61:609-20.
9. Oyarzábal A, Molina V, Jiménez S, Curveco D, Mas R. Efectos del policosanol, el extracto de semillas de uva y su terapia combinada sobre marcadores oxidativos en ratas. *Rev Cubana Farm*. 2010;45(1):87-96.
10. Noa M, Más R. Effect of Policosanol on atherosclerotic plaque composition on aortas of *Macaca arctoides* monkeys. *Arch Med Res*. 2005;36:441-7.

11. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:227-35.
12. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine network amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:561-80.
13. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-9.
14. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science.* 1976;193:1094-100.
15. David J. Lefer. Statins as Potent Antiinflammatory Drugs. *Circulation.* 2002;106:2041-2.
16. Quist-Paulsen P. Statins and inflammation: an update. *Curr Opin Cardiol.* 2010;25(4):399-405.
17. Moore AR. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. *Methods Mol Biol* 2003;225:123-8.
18. Swingle KF, Shideman FE. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther* 1972;183:226-34.
19. Bailey PJ, Sturm A, Lopez-Ramos B. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexamethasone and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* 1982;31(7):1213-8.
20. Worthington Biochemical Corporation. Worthington enzyme manual. New Jersey: Worthington Biochemical Corporation; 1972. p. 43-5.
21. Maxwell MA, Haas SM, Beiber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry.* 1987;87:206-9.
22. Zakaria NM, Islam MW, Radhakrishnana R, Chen HB, Kamil M, Al-Gifrian AN, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Caralluma arabica*. *J Ethnopharmacol.* 2001;76 : 155-8.
23. Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P, Augusto O, Chen, JW, Davies M, et al. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11:2899-937.
24. Di Paola R, Di Marco R, Mazzon E, Genovese T, Bendtzen K, Macri B, Nicoletti F and Cuzzocrea S. Prevention of carrageenan-induced pleurisy in mice by anti-CD30 ligand monoclonal antibody. *Clin Immunol.* 2004;113:64-73.
25. Corsini E, Di Paola R, Viviani B, Genovese T, Mazzo E, Lucchi L, et al. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. *Immunology.* 2005;115(2):253-61.

26. Farias JA, Ferro JN, Silva JP, Agra IK, Oliveira FM, Candea AL, et al. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both *in vitro* and *in vivo* animal models. *Inflammation*. 2011;5(2):764-71.
27. Moore AR. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. *Methods Mol Biol*. 2003;225:123-32.
28. Olajide OA, Awe SO, Makinde JM, Ekhelar AI, Olusola A. Studies on the antiinflammatory , antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:179-86.
29. Rajeswari R, Thejomoorthy P, Mathuram LN, Narayana Raju KVS. Anti-Inflammatory Activity Of *Cassia fistula* Linn. Bark Extracts In Sub-Acute Models of Inflammation In Rats. *Tamilnadu J Veterinary & Animal Sci*. 2006; 2(5):193-9.
30. Ramakrishnan G, Joshua JA, Krishna Goudar, Amit A. Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory activity of different Extracts of *Boswellia serrata* in Wistar Albino Rats. *Intern J Pharm Tech Res*. 2011;3:261-7.
31. Nakano M, Denda N, Matsumoto M, Kawamura M, Kawakubo Y, Hatanaka K, et al. Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression in the late phase of acute inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2007;22:210-8.
32. Marques de Oliveira A, Conserva LM, de Souza Ferro JN, de Almeida Brito F, Lyra Lemos RP, Barreto E. Antinociceptive and anti-Inflammatory effects of octacosanol from the Leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1598-611.

Recibido: 24 de junio de 2013.

Aprobado: 29 de agosto de 2013.

Daisy Carbajal Quintana. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn.sup@cnic.edu.cu