

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Zea mays L. variedad morada y su efecto protector de
daño osteoarticular en artritis inducida en ratas**

TESIS

para optar el grado académico de Doctor en Ciencias de la Salud

AUTORA

Daisy Yesenia Flores Cortez

Lima – Perú

2008

DEDICACION

A mi familia: Elena, Ranulfo, Anderson,
Jony, Andre, Piero y Eduardo

A los Doctores: Eduardo Villalobos,
Manuel Palomino, Armando Rojo, Juan
Rodríguez Tafur, Yngyerman Ramirez y
Heber Muñoz por su apoyo
incondicional en la planeación,
ejecución y publicación de esta
investigación

Este Investigación fue ejecutada con subvención del Consejo Nacional de
Ciencia y Tecnología (**CONCYTEC**)

**UN AGRADECIMIENTO A LOS MIEMBROS DEL JURADO EXAMINADOR Y
CALIFICADOR:**

DR. ARMANDO ROJO MEJIA	(PRESIDENTE)
DR . MANUEL PALOMINO YAMAMOTO	(ASESOR)
DR. JORGE ARROYO ACEVEDO	(MIEMBRO)
DR ERNESTO RAEZ GONZALES	(MIEMBRO)
DR. GUIDO AYALA MACEDO	(MIEMBRO)

POR SU JUSTA Y CORRECTA LABOR EN LA ASESORIA Y EVALUACION
DE ESTA INVESTIGACION

ASESOR DE TESIS

DR . MANUEL PALOMINO YAMAMOTO

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	5
II. GENERALIDADES	7
III. MATERIAL Y METODOS	13
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSIÓN	30
VI. CONCLUSIONES	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo, evaluar el efecto de *Zea mays L* frente a la respuesta inflamatoria y daño articular en ratas con artritis experimental. Se empleó el modelo de artritis inducida por la administración de 200 μ l de pristane en la base de la cola de las ratas. Inmediatamente después los animales fueron separados aleatoriamente en 7 grupos y tratados durante 21 días, como: **G1**(n=5): Vehículo sin pristane, **G2**(n=10): pristane + vehículo ; **G3**(n=10): Pristane + metotrexate 0.1 mg/kg; **G4**(n=10): pristane + indometacina 0.6 mg/kg, **G5**(n=10): Pristane + Sol *Zea mays L* 1% 100 mg/kg; **G6**(n=10): Pristane + Sol *Zea mays L* 10% 100 mg/kg y finalmente **G7**(n=10): Pristane + metotrexato 0.1 mg/kg + Sol *Zea mays L* 1% 100 mg/kg. Se evaluó la progresión de la enfermedad mediante medición interdiaria del edema de la pata derecha y al término de experimento se realizó una valoración radiológica de la zona afectada considerando las características osteoarticulares tales como desmineralización ósea, erosión ósea y de cartílago, periostitis y alineamiento de falanges. Los animales tratados con pristane iniciaron la enfermedad articular a partir del día 12 posterior a la inducción. El porcentaje de inflamación acumulada en el curso del experimento fue como sigue: (G1) $1.50 \pm 0.5^*$, (G2) 13.73 ± 8.4 ; (G3) 14.76 ± 8.8 ; (G4) 14.22 ± 9.0 ; (G5) 10.81 ± 9.1 ; (G6) $5.31 \pm 1.4^*$; (G7) $6.38 \pm 0.5^*$. Por otro lado el puntaje articular total en los grupos de tratamiento fueron: (G1) 2.0, (G2) 35.0; (G3) 6.0; (G4) 19.0; (G5) 19.0; (G6) 15.0; (G7) 10. Los grupos tratados con *Zea mays* 10% y Metotrexate + *Zea mays* 10% mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor a lo largo del experimento que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$). Únicamente los animales con pristane y vehículo, desarrollaron daño articular según valoración radiológica, los tratados con *Zea mays* demostraron efecto protector. Los grupos tratados con metotrexate y metotrexate más *Zea mays* 10%, mostraron puntajes articulares mas bajos, por efecto del tratamiento; sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Palabras clave: *Zea mays L*, maíz morado, artritis experimental, ratas.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the effect of *Zea mays* L at the inflammatory response and articular damage in rats with experimental arthritis. Pristane 0,2 ml was injected in the base of the tail of the rats. Immediately the animals were separated randomized in 7 groups and treated during 21 days, as: **G1**(n=5): Vehicle without pristane, **G2**(n=10): Pristane + Vehicle; **G3**(n=10): Pristane + metotrexate 0,1 mg/kg; **G4**(n=10): pristane + indometacina 0,6 mg/kg, **G5**(n=10): Pristane + *Zea mays* L 1% 100 mg/kg; **G6**(n=10): Pristane + *Zea mays* L 10% 100 mg/kg and **G7**(n=10): Pristane + metotrexato 0,1 mg/kg + *Zea mays* L1% 100 mg/kg. The progression of the disease by means of interdaily measurement of edema of the right paw was evaluated and at the end of experiment we made a radiological validation of the affected zone considering the osteoarticular characteristics such as bone demineralization, cartilage and bone erosion, periostitis and phalange alignment. The rats with pristane begin to develop the disease until the day 12 after the induction. The percentage of accumulated inflammation in the course of the experiment was: (G1) $1.50 \pm 0,5^*$, (G2) $13,73 \pm 8.4$; (G3) $14,76 \pm 8.8$; (G4) $14,22 \pm 9.0$; (G5) $10,81 \pm 9.1$; (G6) $5,31 \pm 1,4^*$; (G7) $6,38 \pm 0,5^*$. In addition the score of articulate damage total in the treatment groups were: (G1) 2,0, (G2) 35.0; (G3) 6.0; (G4) 19.0; (G5) 19.0; (G6) 15.0; (G7) 10. The groups with *Zea mays* 10% and Metotrexate + *Zea mays* 10% showed a significantly smaller inflammatory response throughout the experiment than the other groups of treatment ($p < 0.05$).

The rats treated with metotrexate and metotrexate more *Zea mays* 10%, showed articular score low; nevertheless these differences were not statistically significant.

Key words: *Zea mays* L, purple corn, experimental arthritis, rats.

I. INTRODUCCION

La artritis experimental inducida por pristane es una enfermedad autoinmune mediada por células T CD4 y es tejido específica que afecta sobre todo uniones periféricas cartilaginosas y diartrodiales, aunque pueden presentarse manifestaciones sistémicas típicas. El pristane produce cambios patológicos progresivos y crónicos que incluyen sinovitis con infiltración de polimorfonucleares y mononucleares, formación de panus, erosión de hueso y cartílago y fibrosis articular¹⁻³. Este modelo comparte muchas características clínicas, histológicas, serológicas y genéticas de la artritis en humanos^{4,5}, lo cual la hace atractiva para la evaluación de nuevos agentes terapéuticos potenciales para el manejo de esta enfermedad.

Los fitofármacos constituyen una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades degenerativas crónicas; sin embargo se hace precisa su validación científica y rigurosa para poder ser empleada en pacientes, solos o como tratamiento adyuvante al farmacológico.

El *Zea mays* L, es una planta originaria de los Andes que ha demostrado tener diversas propiedades terapéuticas. A pesar que hay relativamente poca evidencia de sus beneficios en patologías inflamatorias, esta planta ha demostrado presentar efecto protector significativo en diferentes modelos de enfermedades crónicas como aterosclerosis, hipertensión arterial y diabetes mellitus^{6-8,35}, básicamente debido al rol antioxidante de las antocianinas presentes en la planta; por esa razón se plantea su efecto terapéutico en artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria crónica donde una de las hipótesis planteadas acerca de su fisiopatología es la presencia incrementada de radicales libres a nivel plasmático y articular.

Las antocianinas son los principales componentes del maíz morado, en especial el cianidin-3- O-B-D glucósido^{9,10}. En otros estudios, estos han demostrado presentar efecto modulador de radicales libres de oxígeno y diversas citoquinas^{11,12}. Basado en esta afirmación nosotros planteamos como **hipótesis** que el extracto de *Zea mays* L. variedad morada presenta efecto protector osteoarticular en un modelo de artritis experimental inducido en ratas. Para validar nuestra hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar el efecto protector osteoarticular del extracto de *Zea mays L.* variedad morada en la progresión de artritis experimental inducido en ratas.

Objetivos específicos

- Valorar el edema plantar de ratas artríticas tratadas con extracto de *Zea mays L.* variedad morada
- Evaluar el daño articular mediante valoración radiológica, de las ratas artríticas tratadas con extracto de *Zea mays L.* variedad morada

II. GENERALIDADES

2.1.- Modelos animales de artritis experimental: Artritis Inducida por Pristane

Los modelos animales de artritis son ampliamente empleados para explicar los mecanismos de la inflamación, el proceso de autoinmunidad y el desarrollo preclínico de nuevos agentes terapéuticos. El modelo murino de artritis exhibe varias características únicas lo cual incrementa potencialmente su valor como un modelo aplicable para el screening de nuevos agentes antirreumáticos y aprender más acerca de los biomarcadores asociados con la eficacia clínica¹³.

Durante la evaluación preclínica de la eficacia de los compuestos es importante usar modelos animales que no solo sean apropiados y altamente reproducibles sino que también muestren predicción en la eficacia clínica en humanos¹⁴.

Los criterios más importantes para la selección de un modelo experimental incluyen^{14,15}:

- (a) Capacidad de predecir la eficacia en seres humanos
- (b) Fácil uso, reproducibilidad de los datos y duración razonable del periodo de prueba
- (c) Patología similar y/o patogénesis cercana a la enfermedad humana

La artritis inducido por el aceite mineral sintético 2,6,10,14-tetramethylpentadecane, conocido como pristane, es un modelo destacado por su inicio retardado de artritis crónica en aproximadamente 2 semanas después de la inducción, no paralelo a la cronicidad e independiente de la administración del xenoantígeno, el cual es por el contrario requerido para la inducción de artritis en la mayoría de los modelos¹³.

La ausencia de la necesidad de incorporación de un antígeno xenobiótico para inducir la enfermedad junto con el inicio retardado de la inflamación sugiere que la artritis se deriva de la sensibilización constante en el tiempo, en vez de una respuesta inmune aguda. El mecanismo preciso del desarrollo de la enfermedad no esta claro; sin embargo se ha demostrado que el pristane facilita la respuesta autoinmune vía la activación inmune en respuesta a los antígenos encontrados en microorganismos prevalentes en el ambiente¹³.

2.1.1 Características histopatológicas de la artritis inducida por Pristane

El punto clave del modelo de artritis inducido por pristane en ratas es el inicio confiable de inflamación poliarticular, marcada resorción ósea y proliferación de hueso periosteal.¹⁵

La destrucción del cartílago también ocurre pero es desproporcionalmente moderado en comparación a la inflamación y la destrucción ósea.¹⁵

Las principales características histopatológicas son¹³:

- **Inflamación sinovial**; caracterizada por infiltración de células inflamatorias, mononucleares y polimorfonucleares en el tejido sinovial y periarticular
- **Hiperplasia sinovial**
- **Fibrosis sinovial**
- **Vascularidad sinovial y angiogenesis**
- **Formación de tejido panus simil**
- **Erosiones del cartílago**
- **Erosión ósea**

El tejido panus presenta células T activadas, células simil macrófagos, granulocitos neutrófilos, los cuales se encuentran diez veces más elevadas que las células mononucleares, y células de expresión de clase II. Los linfocitos T4 juegan un rol importante tanto en la inducción como en el estadio crónico de la artritis inducido por pristane. Esto sugiere que el pristane puede gatillar la activación de los linfocitos T autoreactivos lo cual permite un cuadro inicial de artritis aguda y subsecuentemente un ataque crónico y de autoperpetuación en las articulaciones^{16,18}.

Por otro lado las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-1 β e IL-6 permanecen elevadas en el tejido inflamatorio hasta 70 días después del inicio de la artritis. Estas citoquinas están intrínsecamente involucradas en la patología de la artritis inducida por pristane. De este modo el empleo del tejido sinovial para el análisis de citoquinas contribuye a evaluar la progresión de la enfermedad¹³.

2.1.2 Características serológicas de la artritis inducida por Pristane

Serológicamente, en la artritis inducida por pristane se detecta factor reumatoide, anticuerpos a proteínas de choque térmico y también se detecta colágeno de tipo I y II¹⁷.

El incremento de niveles séricos de proteína matricial oligomérica de cartílago (COMP) coincide con los cambios erosivos tempranos. Los niveles séricos posteriormente disminuyen. Los niveles séricos de COMP constituyen un posible valor predictivo del grado de destrucción articular¹⁸.

Por otro lado también se ha reportado niveles séricos elevados de IL-6 después de la inyección de pristane; sin embargo durante el estadio crónico no se detectaron IL6 sistémico, por lo que se deduce que en el caso de la artritis inducida por pristane, el IL-6 refleja la respuesta inflamatoria gatillada por el adyuvante pero no necesariamente conectada con el desarrollo de la inflamación crónica¹⁸.

Otra prueba bioquímica plasmáticas que reflejan la inflamación sistémica son la glicoproteína alpha1-acidas (AGP)¹⁷.

2.1.3 Características genéticas de la artritis inducida por Pristane

Se ha demostrado que el *Cia5*, un locus en el cromosoma 10 de la rata, regula la severidad de la artritis inducida por pristane. Brenner demostró que el *Cia5* contiene 3 diferentes locis cuantitativos (QTLs) involucrados. El *Cia5a* y *Cia5d* regula la hiperplasia sinovial, formación de panus, angiogénesis, inflamación sinovial y erosión de huesos y cartílago, sugiriendo que estos dos genes controlan el proceso fundamental en la patogénesis de la artritis. El nuevo QLT *Cia5d*, esta localizado en la porción más centromérica de *Cia5*, y regula solo la artritis inducida por pristane, mientras que *Cia5a* regula la artritis inducida por pristane y colágeno¹⁹.

Todos estos hallazgos demuestran que los efectos reguladores de *Cia5a* o *Cia5d* persisten más allá de los estadios tempranos de la enfermedad y en los estadios de perpetuación crónica. Los eventos sinoviales afectados por la presencia de los intervalos de *Cia5a* o *Cia5d* han demostrado ser al menos en parte interdependientes. Específicamente, la angiogénesis es un evento crítico en la patogénesis de la artritis autoinmune y en el desarrollo de hiperplasia sinovial. De modo similar, la hiperplasia sinovial y la formación de panus están típicamente asociadas con erosión de huesos y cartílago en la artritis y son parcialmente dependientes del infiltrado celular mononuclear inflamatorio y las citoquinas que producen esas células infiltradas. Además varias de las citoquinas producidas por el tejido sinovial y las células mononucleares infiltradas tienen propiedades angiogénicas¹⁹.

Al parecer los genes son los reguladores clave de la actividad de *Cia5a* y *Cia5d* y son requeridos para el desarrollo de inflamación sinovial, artritis y daño articular¹⁹.

En conclusión el modelo de artritis inducida por pristane en ratas es un modelo de artritis inflamatoria crónica, que demuestra respuesta celular y humoral a autoantígenos, elevación de citoquinas articulares y cambios histopatológicos particulares.

B.- Aspectos Generales del *Zea mays L.* variedad morada

El maíz es una planta oriunda de América, una de las plantas más conocidas en el mundo y una de las más antiguas que el hombre haya domesticado²⁰. Se han encontrado restos de este cereal desde Canadá hasta el norte de Argentina; habiendo constituido, junto con el frijol y la papa, uno de los principales alimentos de las numerosas tribus indígenas que poblaban este extenso territorio.

El origen del maíz es muy remoto. Se cultiva en el Perú desde épocas precolombinas; su antigüedad esta comprobada por las mazorcas encontradas en las tumbas así como las representaciones en la cerámica precolombina. En los Andes la representación del maíz está presente prácticamente en todas las culturas y casi siempre en un contexto religioso²⁰. Se considera que Colon lo llevó a España en su primer viaje, en 1498 se cultivó en Castilla y en Andalucía en 1826. Al parecer esta planta es nativa de las alturas de México o América Central, pero no fue conocida en estado silvestre, y se consideraba que no era capaz de mantenerse en competencia con otras plantas silvestres²⁰⁻²²; sin embargo actualmente se han presentado pruebas que señalan que el maíz se ha difundido en Sudamérica en estado silvestre antes de la llegada del hombre²⁰. Las diversas variedades de maíz morado provienen de la raza ancestral Culli (que en quechua significa negro). Las formas típicas están casi extinguidas. La raza Culli es una de las cinco razas ancestrales de las que se han originado todas las demás, actualmente en extinción en el mundo. Existen muy pocas razas que presentan pigmentos antociánicos tanto en el grano como en la tusa. En el Perú la raza Culli se cruzó con otras razas, transfiriendo sus colores característicos a las razas derivadas, como el Sangeronimo, Huancavelicano, Piscoruto, Cuzqueño, Huayleño, Arequipeño e Iqueño; sin embargo se han producido variedades más desarrolladas y de mayor rendimiento mediante la técnica de cruzamiento y selección.

Ubicación Taxonómica del maíz morado

El maíz morado es una planta monocotiledónea de estambres hipogénicos, pertenecientes a la familia de las gramíneas. La posición botánica, según la Dirección del Museo de Historia Natural de la U.N.M.S.M es la siguiente:

División: SPHERMATOPHITA

Clase: MONOCOTYLEDONEAE
Subclase: LILIDAE
Orden: POALES
Familia: POACEAE
Subfamilia: ANDROPOGONOIDEAE
Tribu: MAYDEAE
Genero: Zea
Especie: *Zea mays L.*
Variedad: morada
Nombre vulgar: Maíz morado

En el Perú existen diversas variedades entre ellas tenemos la raza culli que tiene granos rojo-oscuro casi morado que se emplea para la preparación de chicha morada o como colorante de vianda y la variedad haña-kaa (v. Aymara) llamada maíz morado. Otras variedades tradicionales también conocidas son:²²

Cuzco morado: variedad relacionada a la raza Cuzco Gigante. Es tardía, de granos grandes, dispuestos en mazorcas de 8 hileras muy bien definidas. Su cultivo se realiza en zonas de latitud intermedia, en los Departamentos de Cuzco y Apurímac.

Arequipeño: la forma de la mazorca es similar a la variedad Cuzco, pero más chica. Los granos están dispuestos en hileras regulares. El color de la tusa es de menor intensidad y más precoz que otras variedades.

Morado Canteño: derivada de la raza Cuzco, por lo que las características de la mazorca son muy similares, aunque de dimensiones menores. Su cultivo se presenta en diferentes lugares de la sierra del Perú especialmente en las zonas altas del valle de Chillón (Lima) y hasta los 2500 msnm.

Morado de Caraz: Es una variedad derivada de las razas Ancashino y Alazan. Se cultiva en la provincia de Caraz (Ancash) y puede adaptarse también en la costa ya que es de precocidad intermedia. El tamaño del grano es menor que las variedades de origen Cuzqueño. Esta variedad muestra mayor rendimiento y presenta la tusa más pigmentada.

Negro de Junín: Es una variedad precoz, de granos grandes y negros dispuestos irregularmente en una mazorca corta y redondeada. Se encuentra en la Sierra, Centro, Sur, hasta Arequipa, ocupando alturas mayores que el resto de variedades.

Variedad mejorada: La producción de PMV 581, es una variedad mejorada por el programa de maíz (PM) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM); sus características son: mazorca cilindro cónico, granos amiláceos blandos, de color negro y tusa de color morado. La planta tiene un periodo vegetativo medio. Mide de 2.0 a 2.4

metros de altura, con una o dos mazorcas plantados en la longitud del tallo. La selección se hizo con la finalidad de lograr rendimientos altos de pigmento principal antocianina, mejorar su resistencia a las plagas (Roya y Coscospora) y ampliar su adaptación en toda la costa y sierra del Perú. Además se han desarrollado otras variedades como PMV-582 y Negra Tomasa (INIA).

De acuerdo a las zonas de cultivo se conocen como maíz centeno, morado de Caraz, negro de Junín, Cuzco morado, Arequipeño, entre otros; también se cultiva en Ayacucho, Cajamarca y Huancavelica

El maíz Culli de Bolivia es muy parecido al peruano tanto en la intensidad de coloración del grano como en la morfología de la planta y la mazorca²². Es conocida la asociación de coloración de antocianina en plantas de maíz con su distribución altitudinal; maíces distribuidos a niveles de mayor altura presentan alta intensidad de coloración la cual disminuye hasta verde a nivel del mar. El maíz ecuatoriano parece haberse originado del cruzamiento entre el Culli ancestral con razas de mazorcas grandes. El Culli Argentino es parecido al de Ecuador con la diferencia de que los granos son más duros. El negrito chileno tiene la mazorca más chica y los granos más delgados presentando más hileras de granos.

La materia colorante lo componen las antocianinas, de las cuales se han determinado, 3-glucosidos de cianidina, pelargonidina, y peonidina, 3- galactósido de cianidina, libres y acilados⁹⁻¹⁰.

El uso principal desde antiguo es en la preparación de la chicha morada y mazamorra morada; actualmente se preparan extractos acuosos atomizados para ser comercializados como colorantes naturales; aunque los volúmenes de producción aun no compiten con las enocianinas²¹.

III.- MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

Material Biológico

- Ratas albinas hembras consanguíneas cepa Sprague Dawley de 10 semanas de edad; con peso corporal promedio 152.8 +/- 21 g al inicio del experimento
- Mazorcas de *Zea mays L.* variedad morada

Material de Laboratorio

- Pipetas Pasteur
- Gomas de succión
- Beakers 500 y 1000 ml Kimax
- Placas petri
- Jeringas tuberculina
- Sondas metálicas orofaríngeas
- Pinza cortante recta tipo Cizalla Liston recta

Equipos

- Molino de cuchillas (Willey Mill St. Modell N° 3)
- Estufa de aire circulante (Memmert PO VL 40- 220°C)
- Cámara de secado (Lab. Farmacología. UNMSM)
- Cámara de vacío (Lab. Química. UNFV)
- Balanza analítica (Mettler)
- Pletismómetro (Lab. Farmacología. UNMSM)
- Equipo de rayos x (DINAR)
- Equipo de disección

Material Farmacológico y Reactivos

- Alcohol etílico 70%
- Acido acético glacial (Sigma Chemical)
- Pristane (Sigma Chemical)
- Vehículo: Solución salina estéril 0.9% (p/v)
- Compuestos antiinflamatorios de referencia:
 - Indometacina tab 10 mg (indocid®)
 - Metotrexate tab 2.5 mg (Metotrexato ®)
- Cloruro de sodio 0.5%
- Dimeticona 80 mg/ml gts

METODOS

Recolección, secado y molienda del Material Botánico

Se realizó un viaje a los campos de cultivo de *Zea mays L* variedad morada en la Provincia de la Oroya, Departamento de Junín aproximadamente a 4000 m.s.n.m. entre los meses de abril a mayo del año 2006.

La recolección fue realizada a primeras horas de la mañana, solo se recolectaron las mazorcas de *Zea mays L.* variedad morado y se tomo una muestra de la planta entera (raíz, tallo, flor, fruto y tallo de inflorescencia) para su posterior identificación botánica. El material vegetal obtenido fue de aproximadamente 15 kg; el cual fue envuelto en papel craft secante para su transporte a la provincia de Lima.

La planta recolectada se llevó al Laboratorio de Investigación de Farmacología y se expandió en una cámara de secado a una temperatura menor de 40 °C durante 72 hrs.

El carozo de maíz y el grano fueron molidos por separado en un Molino de eléctrico de cuchillas (Willey Mill St. Modell N° 3). La planta seca y molida fue almacenada en frascos de vidrio ámbar para su posterior preparación.

Extracción de Antocianinas a partir del fruto de *Zea mays L.*²³

Se empleó la técnica de extracción de antocianinas según Salinas y col (Laboratorio de Maíz. INIFAP-México) que consiste en la maceración usando tres disolventes distintos: etanol: ácido acético: agua, en proporciones de 10:1:9. Estos disolventes son más efectivos para la extracción de antocianinas y se puede emplear cuando las sustancias extraídas se usarán para consumo crónico.

Cada litro de polución, fue mezclada con 250 g de maíz morado seco y molido. Se almacenó para maceración en un espacio oscuro a temperatura ambiental por 7 días. Finalmente la solución fue filtrada en un embudo Buchner conectado a un kitasato y aspirado al vacío.

El extracto líquido de antocianinas fue colocado en la cámara de vacío y secado a temperatura ambiental; la evaporación se realizó a una presión menor de 50 mmHg por un periodo mínimo de 6 horas.

Se realizaron un total de 10 sesiones de secado al vacío. Debido a las características higroscópicas de las antocianinas; el material seco fue almacenado en un frasco ámbar en una cámara de desecado con silica gel. El extracto se mantuvo a temperatura ambiental y se evito su exposición innecesaria a la luz solar para evitar su degradación.

Se obtuvo un rendimiento de extracto seco aproximado en 0.1%.

Preparación de los animales

Los animales fueron obtenidos del Bioterio del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (CENAN). Posteriormente fueron mantenidas en jaulas de crianza, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 hrs, a una temperatura ambiental aproximada de 23 C°. De igual manera recibieron una dieta balanceada para roedores preparada por el Departamento de Nutrición de la UNALM y agua *ad libitum*. El informe de los ensayos realizados a la dieta fue como sigue:

Ensayos Microbiológicos

ENSAYOS	RESULTADOS
1. N. Coliformes totales	< 3
2. Det. Salmonella sp. (en 25 g)	Ausencia
3. N. Mohos (UFC/g)	< 10 estimado
4. N. Levaduras	< 10 estimado

Ensayos Físico/químicos

ENSAYOS	RESULTADOS
1. carbohidratos (g/100g de muestra original)	59.8
2. Energía total (Kcal/100g de muestra original)	341.8
3. Cenizas totales (g/100g de muestra original)	5.0
4. Fibra cruda (g/100g de muestra original)	2.2
5. Grasa cruda (g/100g de muestra original)	3.4
6. Humedad (g/100g de muestra original)	13.8
7. Proteína cruda (g/100g de muestra original)	18.0

Modelo de Artritis Inducido por Pristane^{13-17,24}

La artritis inducida por adyuvante en ratas se utiliza comúnmente para evaluar los compuestos que pudieran ser de uso potencial para el tratamiento de la artritis reumatoide y de otras condiciones inflamatorias crónicas. Este método consistió en la inyección de Pristane 200 ul vía subdérmica en la base de la cola de las ratas. El pristane desencadena una reacción inmune cuya característica principal implica la destrucción inflamatoria del cartílago y del hueso de las falanges distales con edema concomitante de tejidos finos circundantes.

La administración se realizó el día 1 del experimento. Las evaluaciones se realizaron tres veces por semana hasta el día 21 del experimento. El día 22, los animales fueron eutanizados y se seccionó la pata derecha para su posterior evaluación.

Inducción de artritis y tratamiento

En el día 1, todos los animales fueron inmunizados con 200 ul de pristane aplicado vía subdérmica en la base de la cola de las ratas.

Después de la inyección del Pristane, se aplicó presión en el sitio de inyección para prevenir la salida de la suspensión.

Inmediatamente después de la inducción; los animales fueron distribuidos aleatoriamente y tratados vía oral diariamente de la siguiente manera:

- a. **Grupo experimental 1 (n= 5):** Vehículo
- b. **Grupo experimental 2 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Vehículo
- c. **Grupo experimental 3 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Metrotrexate 0.1mg/ Kg
- d. **Grupo experimental 4 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Indometacina 0.6 mg/kg
- e. **Grupo experimental 5 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Solución de Zea mays L. 1% 100 mg/kg
- f.- **Grupo experimental 6 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Solución de Zea mays L. 10% 100 mg/kg
- g.- **Grupo experimental 7 (n= 10):** Pristane 0.2 mL + Metrotrexate 0.1 mg/kg + Zea mays L. 1% 100 mg/kg

Se monitorizó a los animales diariamente, evaluando los signos de artritis y registrando el peso dos veces por semana.

Evaluación de la respuesta inflamatoria

Se registró el desarrollo de la inflamación mediante el pletismómetro (Laboratorio de Farmacología. Facultad de Medicina. UNMSM) antes de la inducción de artritis y tres veces por semana desde el primer día después de la inmunización con el adyuvante. El edema de la pata derecha se expresa como el incremento de volumen de la pata:

$$\% \text{ inflamación} = (V_{tx} - V_{to}) / V_{to} \times 100$$

Donde V_{tx} es el volumen de la pata inflamada a un tiempo x y V_{t0} es el volumen normal de la pata.

Evaluación Radiológica

El día 22, las ratas fueron sacrificadas y las patas fueron seccionadas para su evaluación radiológica. Todas las radiografías fueron tomadas con film de rayos X sensible al verde, estableciéndose técnicas radiográficas de 46 Kv, con 5 mAs y 50 mA como foco fino. Las patas fueron colocadas 60 cm por debajo de la fuente de rayos X^{25,26}.

Cada imagen radiológica fue evaluada por el método de Clark y col (1979)²⁷, por un radiólogo entrenado tomando en cuenta los parámetros de desmineralización y erosión ósea, periostitis y alineamiento de falanges con una escala de 0-3, tal como se describe a continuación:

Valoración radiológica de los parámetros osteoarticulares según Clark y col²⁷

Características	Puntaje articular			
	0	1	2	3
Desmineralización ósea	No presente	Poco significativa	Claramente significativa	pronunciada
Erosión ósea y de cartílago	No presente	Poco significativa	Claramente significativa	pronunciada
Periostitis	No presente	Poco significativa	Claramente significativa	pronunciada
Alineamiento de falanges	Normal	Cambios leves	Cambios moderador	Cambios severos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar de la media para todas las mediciones obtenidas.

Se realizó el test DMS y Tukey, para observaciones pareadas entre 2 grupos o ANOVA para comparación de múltiples grupos. Se fijó el nivel de confianza en menos del 95% ($p < 0,05$).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La eutanasia de los animales permitió una rápida pérdida de conciencia sin dolor o miedo, seguido por un alivio progresivo hasta la muerte del animal.

Para efectos de este experimento se eligió el método de eutanasia inducido por Pentobarbital 60 mg/kg; considerado un método aceptable para roedores por el Report of the AVMA Panel on Eutanasia (1993) y el Euthanasia of Experimental Animals, de la Unión Europea (1995)⁵³.

IV. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CRONICA EN RATAS CON ARTRITIS INDUCIDA POR PRISTANE

La evaluación de la respuesta inflamatoria mediante pletismometría fue realizada durante 19 días. El cuadro 1 y gráfico 1 muestra que el grupo pristane presentó un porcentaje de inflamación ascendente siendo su pico máximo el día 19. De igual modo en el grupo tratado con pristane + metotrexate y pristane + indometacina se observó un incremento gradual de inflamación siendo el nivel máximo, el último día de medición. El grupo tratado con pristane + *Zea mays* 1% mostró un incremento lento de la inflamación hasta el día 8; luego del cual mostró porcentajes de inflamación similares a los grupos anteriores. El pico máximo de inflamación en el grupo pristane+ *Zea mays* 10% fue en el día 5 luego del cual los porcentajes disminuyeron, manteniéndose por debajo de los grupos anteriores hasta el día 19 de tratamiento.

Finalmente el grupo tratado con pristane + metotrexate + *Zea mays* 10%, evidenció un mayor porcentaje de inflamación en el día 5, manteniéndose porcentajes de inflamación cercanos al grupo anteriormente descrito **(Cuadro y Gráfico N° 1)**. Las ratas tratadas con *Zea mays* 10% y metotrexate más *Zea mays* 1% mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$).

El *Zea mays* L previene la respuesta inflamatoria crónica, al inhibir el edema de pata derecha de ratas con artritis inducida por pristane de un modo dosis dependiente. La mayor potencia del producto se evidencia con una dosis de 100 mg/kg y a una concentración de 10% **(Cuadro y Gráfico N° 1)**.

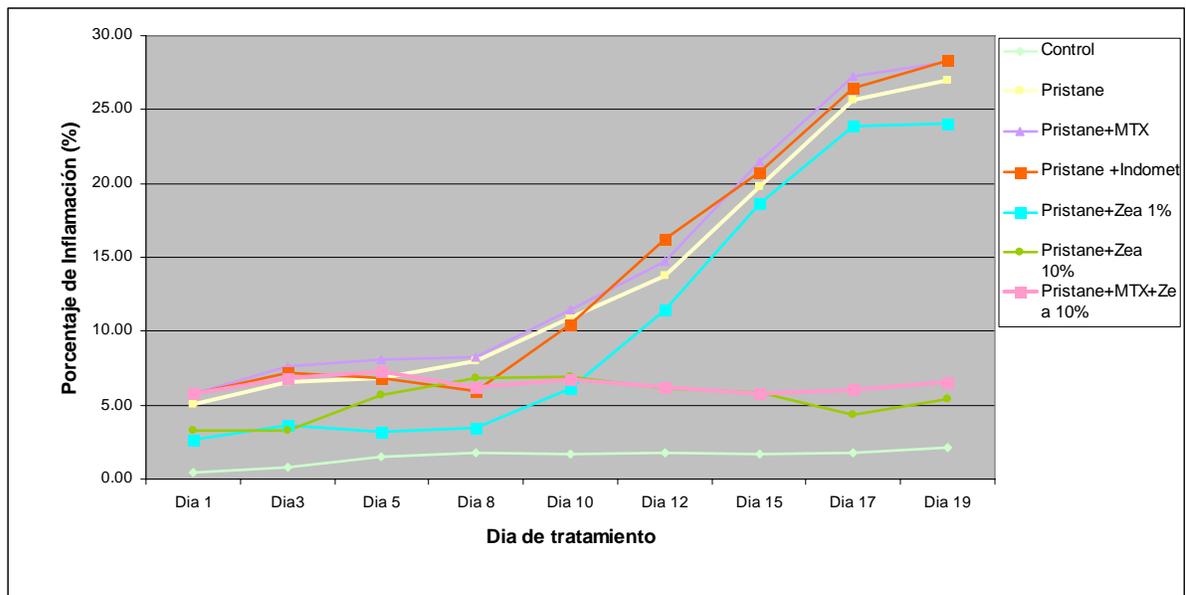
Según el modelo estadístico de dos factores con medidas repetidas no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inflamación entre los grupos de tratamiento durante los primeros 10 días de la enfermedad ($p < 0.05$) **(Cuadro N° 1)**.

Cuadro N° 1.- Evaluación de la respuesta inflamatoria en ratas artríticas tratadas con *Zea mays L*

Grupo	n	Porcentaje de Inflamación (%)								
		Día 1	Día 3	Día 5	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15	Día 17	Día 19
Control	10	0.45±0.48	0.78±0.63	1.55±1.06	1.77±1.88	1.66±1.78	1.78±1.62*	1.65±1.74*	1.76±1.80*	2.10±1.47*
Pristane	10	5.03±3.91	6.60±6.33	6.83±6.13	7.99±7.56	10.92±8.23	13.79±7.20	19.76±10.29	25.67±7.53	26.95±5.90
Pristane+MTX	10	5.80±3.11	7.60±7.27	8.05±7.64	8.22±8.41	11.43±8.42	14.72±12.01	21.49±15.35	27.25±14.45	28.24±14.73
Pristane +Indomet	10	5.79±6.18	7.20±5.58	6.87±6.74	5.91±7.146	10.48±8.44	16.22±7.46	20.74±7.40	26.44±5.97	28.33±7.37
Pristane+Zea 1%	10	2.69±4.24	3.64±3.80	3.21±3.41	3.44±3.18	6.17±4.70	11.49±7.45	18.64±6.69	23.88±7.38	24.09±8.21
Pristane+Zea 10%	10	3.32±2.09	3.32±2.09	5.69±2.77	6.81±5.03	6.90±4.26	6.16±3.98*	5.90±4.18*	4.31±4.30*	5.37±3.50*
Pristane+MTX+Zea 10%	10	5.74±2.53	6.81±3.82	7.31±4.13	6.20±4.66	6.75±5.21	6.23±5.71*	5.75±6.18*	6.00±4.87*	6.59±5.94*

*p<0.05

Grafico N° 1.- Curso de la Inflamación crónica en ratas artríticas inducida por pristane tratadas con *Zea mays L.*

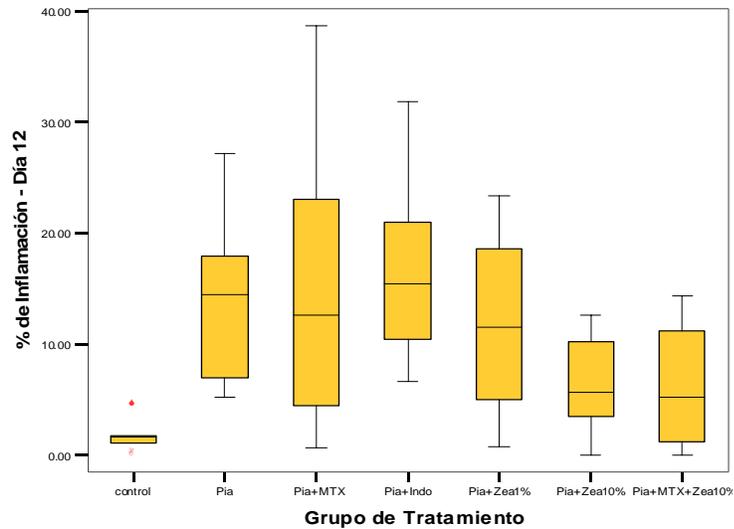


En este gráfico se muestra el curso evolutivo de la inflamación crónica durante todo el periodo de tratamiento. El grupo control presentó mediciones homogéneas de volumen de pata durante todo el periodo del experimento. Así mismo los grupos tratados con pristane más *Zea mays L* 10% y metotrexate más *Zea mays* 1% no presentaron cambios significativos en la respuesta inflamatoria inducida por pristane a lo largo del periodo experimental. ($p < 0.05$)

Los grupos tratados con pristane sólo y pristane más metotrexate presentaron un incremento de la respuesta inflamatoria a partir del día 15 de tratamiento. Antes de ese tiempo los resultados son homogéneos.

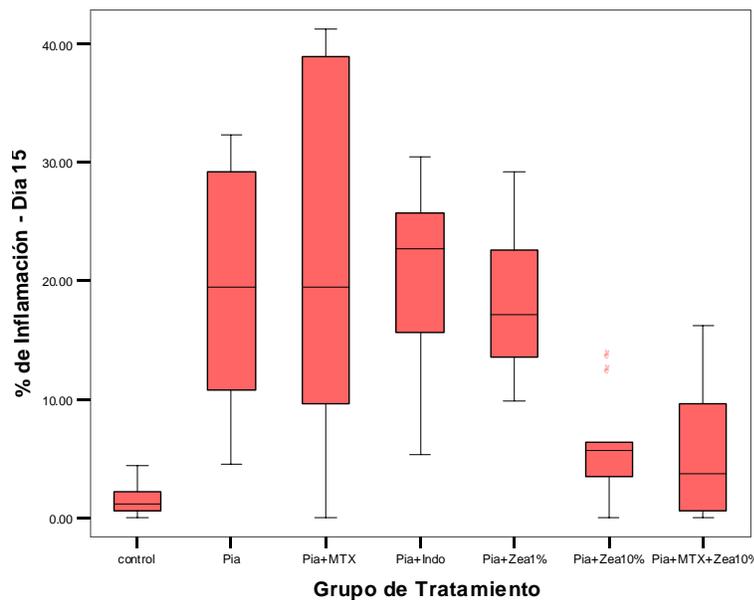
Así mismo, los grupos tratados con pristane más indometacina y pristane más *Zea mays* 1% muestran una mayor respuesta inflamatoria a partir del día 12 de tratamiento.

Grafico N° 2.- Evaluación del porcentaje de inflamación en la pata trasera derecha de ratas artríticas en el día 12 de tratamiento con *Zea mays L*



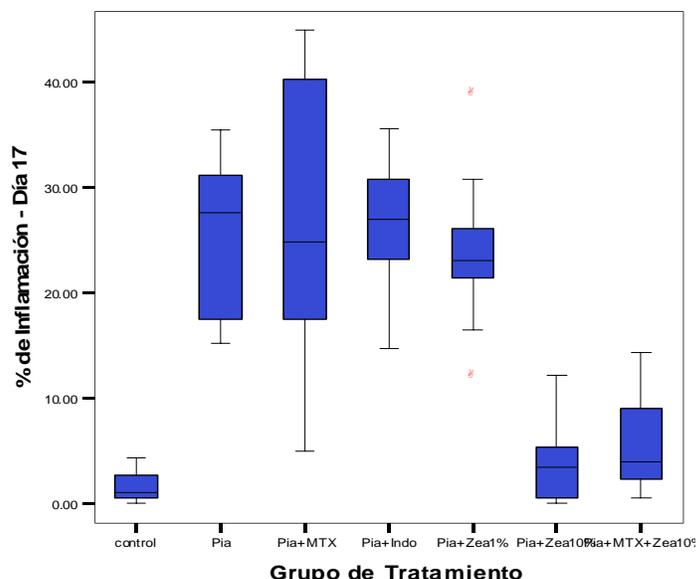
El día 12 de la inducción de la artritis se evidencia un significativo incremento en el porcentaje de inflamación en los grupos tratados con metotrexate e indometacina; mientras que los otros grupos presentan mediciones homogéneas. ($p < 0.05$)

Grafico N° 3.- Evaluación del porcentaje de inflamación en la pata trasera derecha de ratas artríticas en el día 15 de tratamiento con *Zea mays L*



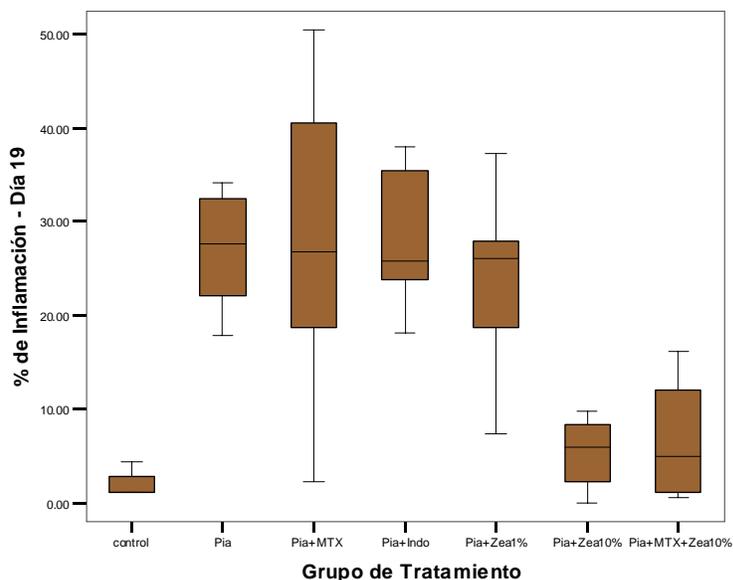
El día 15 las ratas pretratadas con pristane, evidencian edema de pata trasera derecha en los grupos tratados con metotrexate, indometacina y *Zea mays* 1%. Las diferencias estadísticas entre los grupos mencionados y los grupos control, *Zea mays* 10% y *Zea mays* 10% más metotrexate fueron significativas ($p < 0.05$).

Grafico N° 4.- Evaluación del porcentaje de inflamación en la pata trasera derecha de ratas artríticas en el día 17 de tratamiento con *Zea mays L*



En el día 17 los animales tratados con *Zea mays* 10% y *Zea mays* 10% más metotrexate mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$).

Grafico N° 5.- Evaluación del porcentaje de inflamación en la pata trasera derecha de ratas artríticas en el día 19 de tratamiento con *Zea mays L*



Al término del experimento sólo los animales tratados con *Zea mays* 10% y *Zea mays* 10% más metotrexate mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor que los otros grupos de tratamiento ($p < 0.05$). No se presentaron diferencias entre las mediciones de los grupos *Zea mays* 10% y *Zea mays* 10% más metotrexate.

Cuadro N° 2.- Porcentaje de inflamación acumulada en ratas con artritis tratadas con *Zea mays* L.

Grupo de Tratamiento	% Inflamación acumulada (%)
Control	1.50 ± 0.5*
Pristane	13.73 ± 8.4
Pristane+MTX	14.76 ± 8.8
Pristane +Indomet	14.22 ± 9.0
Pristane+Zea 1%	10.81 ± 9.1
Pristane+Zea 10%	5.31 ± 1.4*
Pristane+MTX+Zea 10%	6.38 ± 0.5*

El porcentaje de inflamación acumulado es menor en el grupo Pristane + *Zea mays* 10%, seguido del grupo Pristane + Metotrexate + *Zea mays* 10%. Se presenta un mayor porcentaje de inflamación en el grupo pristane + metotrexate (**Cuadro N° 2; Gráfico N° 1**).

4.2 RESULTADOS DE LA VALORACION RADIOLOGICA DE LAS PATAS DE RATAS CON ARTRITIS INDUCIDA POR PRISTANE

El Cuadro N° 3 y el Gráfico N° 6 muestran que los animales tratados con *Zea mays* 10% más metotrexate presentaron menor grado de desmineralización ósea. ($p < 0.05$)

El pristane fue el único grupo donde se evidencia erosión ósea y de cartílago significativamente mayor que los otros grupos de tratamiento. Lo que indica que los demás tratamientos previenen el daño del cartílago.

Se presentó periostitis en animales tratados con pristane, indometacina y *Zea mays* 1%. Las ratas tratadas con metotrexate presentan un mejor alineamiento de falanges.

Cuadro N° 3.- Efecto de *Zea mays L* en la destrucción articular en la pata trasera derecha de ratas con artritis inducida por pristane

Tratamiento	Desmineralización ósea	Erosión ósea y de cartílago	Periostitis	Alineamiento de falanges	Puntaje articular total
Control	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0
Pristane	7.0	14.0*	7.0*	7.0	35.0*
Pristane+MTX	3.0	3.0	0.0	0.0	6.0
Pristane +Indomet	5.0	8.0	4.0*	2.0	19.0
Pristane+Zea 1%	4.0	7.0	3.0*	5.0	19.0
Pristane+Zea 10%	4.0	6.0	2.0	3.0	15.0
Pristane+MTX+Zea 10%	1.0	4.0	2.0	3.0	10.0

p<0.05 comparado con control

Los resultados corresponden a la sumatoria total de puntaje articular, por grupo de tratamiento. ¹²

Grafico N° 6.- Valoración radiológica de las articulaciones de la pata trasera derecha de ratas tratadas con *Zea mays L*

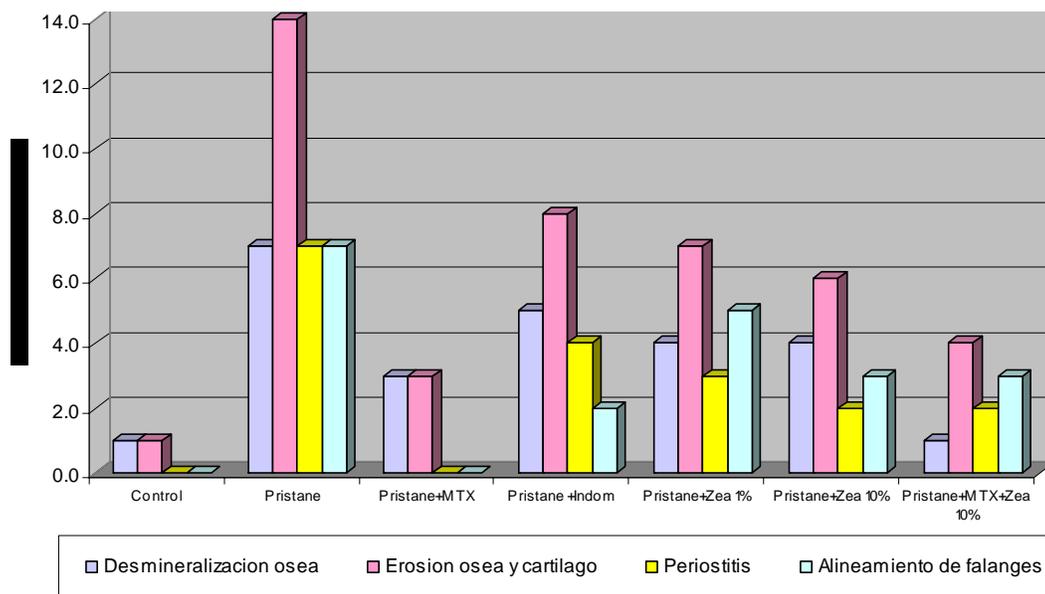
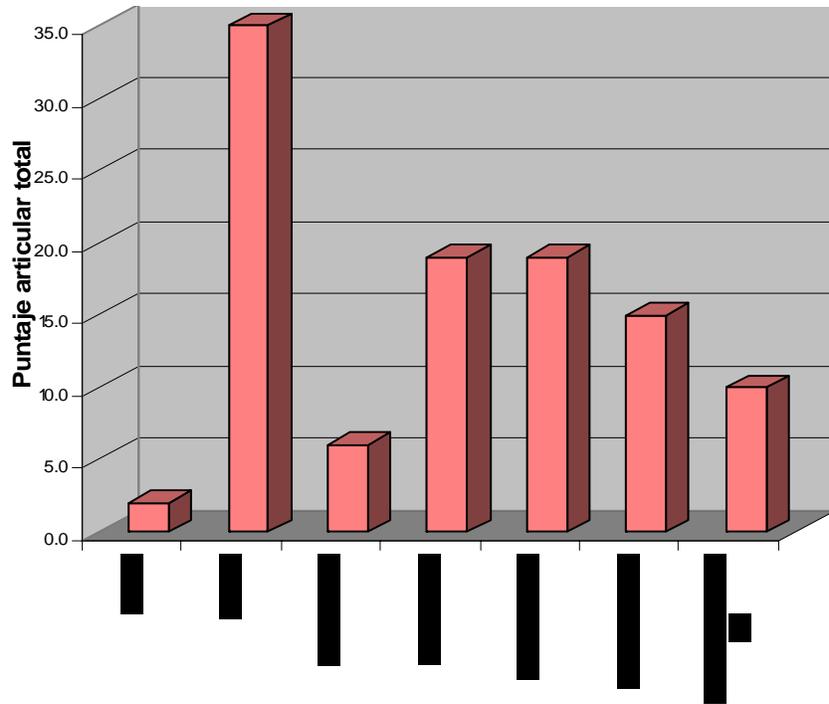


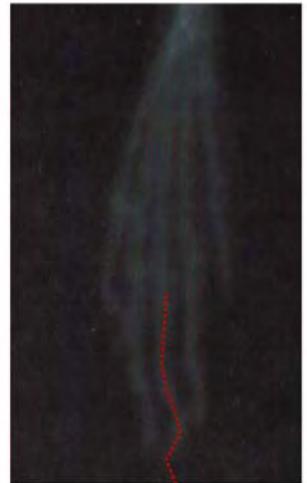
Grafico N° 7.- Puntaje radiológico promedio de articulaciones de la pata trasera derecha de ratas tratadas con *Zea mays L*



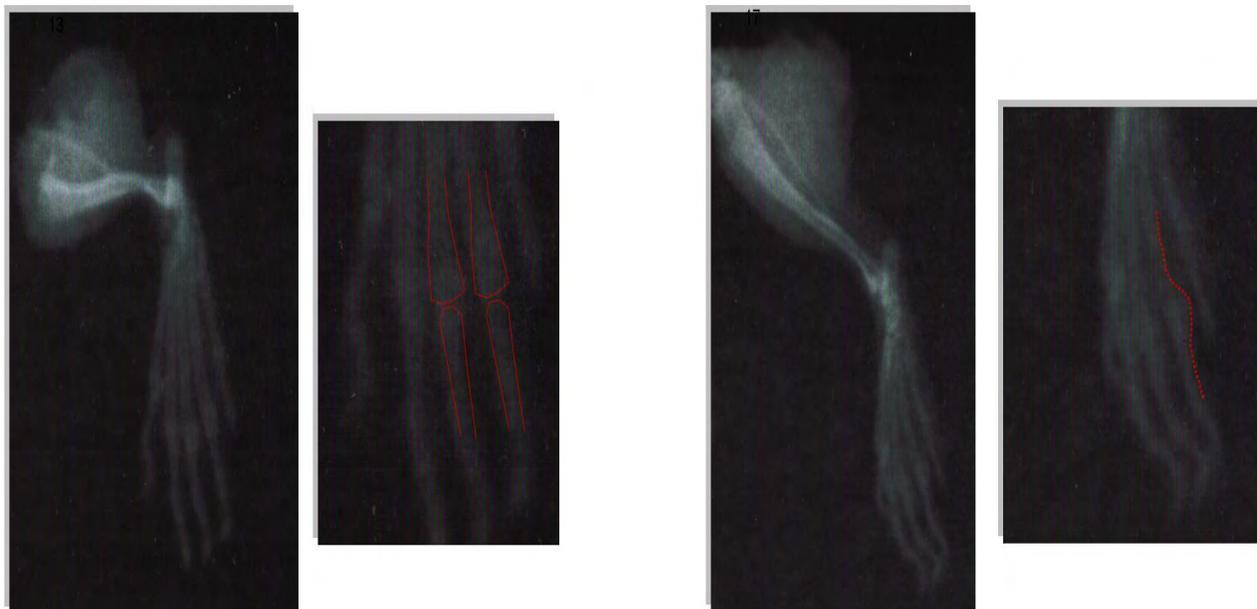
Los animales con pristane desarrollaron artritis, tal como lo muestra el gráfico N° 6 y 7. El puntaje articular total es significativamente mayor que el grupo control. Los grupos tratados con metotrexate y metotrexate más *Zea mays* 10%, mostraron puntajes articulares bajos; sin embargo estas diferencias no fueron significativas al 95%.



Fotografía N°1.- Radiografía de la pata derecha de una rata sin artritis



Fotografía N°2.- Desalineamiento de falange del primer dedo de la pata derecha de las ratas con artritis inducida por pristane



Fotografía N°3.- Deformación articular de 3° y 4° falanges de la pata derecha de las ratas con artritis inducida por pristane

RESULTADOS DE LOS REGISTROS DE LOS PESOS EN EL CURSO DEL EXPERIMENTO

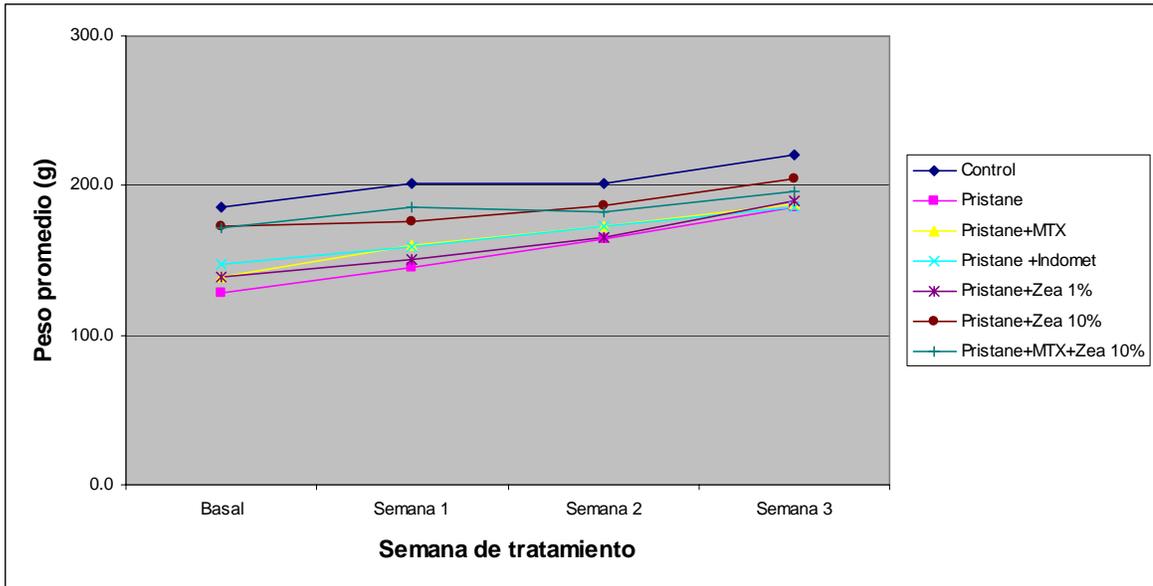
Cuadro N° 4.- Distribución semanal de los pesos de las ratas durante el periodo experimental

Grupo	PESOS PROMEDIO DURANTE EL EXPERIMENTO (g)			
	Basal	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Control	185.8±1.3	201.2±2.3	201.4±3.6	220.8±3.4
Pristane	128.3±19.5	145.3±15.9	164.2±14.9	185.1±14
Pristane+MTX	139.3±15.7	160.6±16.2	172.7±13.7	187.5±22.6
Pristane +Indomet	147.1±12.3	159.2±12	173.3±10.2	185.2±11.3
Pristane+Zea 1%	139.0±12.3	150.4±12	165.1±10.2	189.9±11.3
Pristane+Zea 10%	172.7±6.8	175.5±10.3	186.8±9.3	204.1±10.6
Pristane+MTX+Zea 10%	171.7±4.6	185.2±6.4	182.3±6.2	196.2±12.3

En todos los grupos los animales mostraron incremento gradual del peso corporal a lo largo del experimento, no presentándose diferencias estadísticamente significativas

entre los mismos. Este dato excluye el peso como factor interviniente de las mediciones de la inflamación.

Grafico N° 8.- Evolución de los pesos promedios de las ratas en el curso del experimento



V. DISCUSION

En la medicina contemporánea, aproximadamente el 25% de los medicamentos son derivados de plantas²⁸. Por lo que es prometedor que el reino vegetal pueda proveer una fuente útil de nuevos compuestos antiinflamatorios para el desarrollo de agentes farmacéuticos o alternativamente como complemento a la terapia ya existente. Sin embargo los productos herbarios deben reunir diferentes criterios enmarcados en cuanto a los niveles de seguridad, eficacia y calidad, a efecto de hacer llegar un producto terapéutico altamente confiable a la población²⁹.

El *Zea mays Linne* variedad morada (maíz morado) ha sido cultivada en América Latina, especialmente en Perú y ha sido consumido desde la época del incanato. El uso principal es en la preparación de la chicha (refresco) y mazamorra morada (dulce o postre)²¹. Este compuesto también ha sido usado como un colorante natural en Sudamérica y más recientemente en Asia y Europa^{21,30}.

Hasta hace poco tiempo este fruto ha adquirido gran interés en el campo de la investigación en salud, debido al alto contenido de antocianinas (responsable del color morado del maíz) que este presenta. Las antocianinas son antioxidantes naturales presentes en frutos, vegetales, raíces, flores y semillas que poseen actividad farmacológica, biológica y terapéutica contra los radicales libres de oxígeno (ROS), estrés oxidativo y en consecuencia en enfermedades en que los ROS pueden jugar un rol en el daño tisular a nivel cardíaco, en afecciones isquémicas, en tumores, en afecciones carcinogénicas y en algunas entidades reumáticas.^{11,12;31-34}.

En este estudio presentamos una evaluación del producto natural, *Zea mays L* frente a la respuesta inflamatoria y daño articular de ratas con artritis experimental. Nuestros resultados muestran que ni la indometacina sola, ni el metotrexate, ni el *Zea mays* 1% pudieron detener las manifestaciones clínicas de la enfermedad inducida por pristane.

El edema plantar, signo de la inflamación en la artritis, se manifestó a partir del 12avo día posterior a la inducción acentuándose en forma creciente hasta el término del experimento, tal y como se describe en el modelo experimental estándar¹³. Sin embargo; los animales tratados con *Zea mays* 10% y Metotrexate + *Zea mays* 10% mostraron una respuesta inflamatoria significativamente menor a lo largo del experimento ($p < 0.05$); lo cual indica que estos animales no desarrollaron signos

clínicos de la enfermedad tal como también lo demuestran las pruebas radiológicas donde la escala total es significativamente menor que las ratas tratadas con Pristane. Según nuestros resultados en el **Cuadro N° 2**, el *Zea mays* 10% independiente o con metotrexate presentaron la misma eficacia antiinflamatoria (5.3 vs. 6.3% de inflamación acumulada). De esta manera se demuestra que el *Zea mays L* previene la respuesta inflamatoria crónica, al inhibir el edema de la pata de ratas con artritis inducida por pristane de un modo dosis dependiente. La mayor potencia del producto se evidencia con una dosis de 100 mg/kg y a una concentración de 10% (**Cuadro y Gráfico N° 1**). Por otro lado se empleó la combinación de metotrexate y *Zea mays* 1% como tratamiento para evaluar un posible mecanismo sinérgico entre ambas; sin embargo no se demuestran diferencias significativas en los resultados.

Estos resultados coinciden con trabajos publicados previamente donde se demuestra los efectos antiinflamatorios de las antocianinas de otros frutos, en especial, el cianidin 3-O-D glucosido, que ha disminuido significativamente el TNF α , IL1-B sérico y PGE₂ en tejido articular^{31,34}.

Los estudios fitoquímicos realizados por otros autores señala que el 30.5 a 47.1 % de los compuestos fenólicos presentes en el maíz morado lo constituyen las antocianinas; siendo las principales antocianinas presentes en el maíz morado el cianidin-3-glucosido, pelargonidin-3- glucosido, peonidin-3-glucosido, cianidin-3-maloilglucosido, pelargonidin-3- maloylglucosido y peonidin-3- maloilglucosido y 35.6-54% de las antocianinas son aciladas^{9,10,36}.

A pesar que la fisiopatología de la artritis experimental no ha sido completamente comprendida, los ROS han sido implicados en su patogénesis. Los ROS son especies químicas transitorias altamente reactivas (NO y anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) con el potencial para iniciar daño celular (proteínas, lípidos y ADN) en el tejido articular especialmente en pacientes con artritis³⁷.

En la artritis, el estrés oxidativo induce inestabilidad genómica, senescencia replicativa y disfunción de condrocitos en el cartílago, sugiriendo que el estrés oxidativo conduce a senescencia de condrocitos y envejecimiento del cartílago, y que podría ser responsable para el desarrollo de osteoartritis. Los nuevos esfuerzos para prevenir el desarrollo y progresión de osteoartritis puede incluir estrategias e intervenciones con el objetivo de reducir el daño oxidativo en el cartílago articular³⁸.

Los ROS son producidos en el sitio de la sinovitis por macrófagos y polimorfonucleares o por reperfusión mecánica y puede contribuir al mantenimiento de la inflamación mediante la activación de moléculas inflamatorias que conducen a la destrucción del cartílago articular^{39,40}. En la osteoartritis se ha demostrado la generación de radical hidroxilo, en aspirado de fluido articular y sangre de pacientes afectados con esta entidad⁴¹. Altindag y col hallaron daño significativo del DNA, inducidos por ROS en linfocitos de sangre periférica en pacientes con artritis³⁹. En otros estudios se observó disminución de los niveles de estado antioxidante total, e incremento del índice de estrés oxidativo^{42,43}.

El sistema de defensa antioxidante enzimático superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa que protegen a la célula contra la toxicidad del oxígeno y la lipoperoxidación también se encuentran alteradas en la artritis humana y en modelos animales de esta enfermedad. Regan⁴⁴ concluyó que el SOD está disminuido en pacientes con osteoartritis y en animales con artritis experimental. Así mismo se encontró niveles totales de glutathion significativamente más bajos en pacientes con artritis reumatoidea comparados con hombres sanos. Además, la concentración de vitamina C (un antioxidante natural) en el plasma también fue menor que en los sujetos controles y las concentraciones séricas de MDA (malondialdehído) fueron elevadas en estos pacientes⁴⁵. Estos resultados confirman que el inadecuado control del ROS juega un rol importante en la fisiopatología de la artritis

Los nuevos esfuerzos para prevenir el desarrollo y progresión de artritis puede incluir estrategias e intervenciones con el objetivo de reducir el daño oxidativo en el cartílago articular³⁸.

Según el análisis radiológico, el *Zea mays L* parece tener un rol importante al disminuir la progresión de la enfermedad y reducir significativamente la inflamación plantar y los parámetros radiológicos tales como; desmineralización ósea, la erosión ósea y de cartílago, periostitis y alineamiento de falanges, comparado con ratas tratadas con pristane solo **(Cuadro N°3)**.

Uno de los principales metabolitos antocianínicos del *Zea mays L* es el cianidin-3-O-B-D glucosido (C3G). Este compuesto es una típica antocianina, que tiene actividad antioxidante significativa en ratas in vivo y capturador de radicales superóxido e

hidroxil⁴⁶⁻⁴⁸. Las antocianinas del maíz morado han demostrado tener mayor estabilidad y mayor capacidad antioxidante que otras plantas^{30,49}. Por otro lado, He y col³³ han demostrado que la antocianina cianidin 3-O-B-D- glucósido podría proteger contra el edema en patas de ratas con artritis experimental y aliviar la reacción inflamatoria en las articulaciones, mediante inhibición de citoquinas proinflamatorias como TNF α en el proceso inflamatorio agudo y un mecanismo antioxidante a través del incremento de la actividad de glutatión reducido y superóxido dismutasa que mejoran la capacidad antioxidante total y secuestran los radicales libres, talvez como resultado de la disminución de los niveles de PGE2 en los tejidos de las patas y el TNF α sérico; sugiriendo el posible mecanismo farmacológico en el control del proceso inflamatorio articular.^{33,50}

De igual modo, estudios previos muestran que las antocianinas, componentes de algunas otras plantas limitaron la inflamación mediante la disminución de los niveles de citoquinas y PGE2 en tejido de la pata de ratas artríticas inducidas por adyuvante^{33,51,52}.

Por otro lado, las proantocianinas derivadas de la uva atenúan la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) e incrementan la cantidad de formación de malondialdehído en el plasma de pacientes con esclerosis sistémica; lo cual explicaría otro posible mecanismo antiinflamatorio y antioxidativo de las antocianinas del *Zea mays*.⁵⁴

Los hallazgos de Karlsen A y col⁵⁵ demuestran que las antocianinas inhibieron la activación del factor nuclear κ -B en monocitos y reduce las concentraciones plasmáticas de mediadores pro-inflamatorios en sujetos sanos. De igual modo se ha observado que las antocianinas oligoméricas de la corteza de pino previenen la activación del NF- κ B en exposición a la radiación ultravioleta. Las mismas procianidinas son también potentes moduladores del metabolismo de óxido nítrico.⁵⁶

En nuestro estudio podemos presumir que el efecto antiinflamatorio y protector de daño articular de *Zea mays* se debe probablemente a la elevada cantidad de antocianinas presentes en esta planta, las cuales tendrían un rol importante en la modulación de los ROS y citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IL1-B y PGE₂; además de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y NF- κ B.

Finalmente las antocianinas del *Zea mays* han demostrado un efecto antiproliferativo al modificar la carcinogénesis colorectal en ratas³⁵, infiriéndose su posible efecto inmunosupresor e inhibidor de la proliferación de panus sinovial⁵⁷.

El aporte científico que presentamos permitirá la posibilidad de continuar en la investigación hasta descifrar el principio activo del *Zea mays L* y elaborar una presentación farmacéutica que garantice su efecto protector articular.

VI. CONCLUSIONES

- Las antocianinas del *Zea mays L* (maíz morado) 10% reduce el proceso inflamatorio de la artritis inducida por pristane en ratas con una eficacia de 61.2%.
- Las antocianinas del *Zea mays L* (maíz morado) disminuye la progresión de daño osteoarticular en un 58%, según evaluación radiológica, en ratas con artritis inducida por pristane.
- Las antocianinas del *Zea mays L* (maíz morado) presenta efectos antiinflamatorios articulares dosis dependiente.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Williams RO. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. Clin Exp Immunol. 1998;114(3):330-2.
2. Zheng CL, Hossain MA, Kukita A, Ohki K, Satoh T, Kohashi O. Complete Freund's adjuvant suppresses the development and progression of pristane-induced arthritis in rats. Clin Immunol. 2002;103(2):204-9.
3. Wester L, Olofsson P, Ibrahim SM, Holmdahl R. Chronicity of pristane-induced arthritis in rats is controlled by genes on chromosome 14. J Autoimmun. 2003;21(4):305-13.
4. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001;1(4):377-85.
5. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for Rheumatoid Arthritis. Ann Rheum Dis. 2007;29
6. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J Nutr. 2003;133(7):2125-30
7. Shindo M, Kasai T, Abe A, Kondo Y. Effects of dietary administration of plant-derived anthocyanin-rich colors to spontaneously hypertensive rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2007;53(1):90-3.
8. Flores D. Efecto del extracto acuoso de *Zea mays L* variedad morada sobre la presión arterial en ratas. (Tesis). Lima-Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de san Marcos: 2003.
9. Salgado J, Menguan E. Determinación de compuestos fenólicos en estilos, estigmas, estambres y bracteas en la especie vegetal *Zea mays L* variedad morada. (Tesis). Lima-Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de san Marcos: 2000.
10. Aoki H, Kuze N, Kato Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays L.*). Foods Food Ingrid Jap. 2002; 199: 41- 45.
11. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. J Agric Food Chem. 2005;53(23):9268-73.
12. Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays L*). J Agric Food Chem. 2006;54(13):4557-67.

13. Patten C, Bush K, Rioja I, Morgan R, Wooley P, Trill J, Life P. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct;50(10):3334-45
14. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 29
15. Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E, Guy M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol.* 1999;27(1):134-42.
16. Stasiuk LM, Ghoraishian M, Elson CJ, Thompson SJ. Pristane-induced arthritis is CD4+ T-cell dependent. *Immunology.* 1997;90(1):81-6.
17. Olofsson P, Holmdahl R. Pristane-induced arthritis in the rat. *Methods Mol Med.* 2007;136:255-68.
18. Vingsbo C, Sahlstrand P, Brun JG, Jonsson R, Saxne T, Holmdahl R. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1675-83.
19. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL, Gulko PS. The non-MHC quantitative trait locus Cia5 contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, and joint damage in collagen- and pristane-induced arthritis. *J Immunol.* 2005;174(12):7894-903.
20. Bonavia D. Historia del Maíz. *Acta Herediana.* 1991; 12: 6-16
21. Lock O. *Colorantes Naturales.* Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1era edición. 1997. p208-9
22. Derteano C. *El maíz en el Perú.* Sociedad Nacional Agraria. Lima: 1980
23. Salinas Y, Rubio D, Díaz A. Extracción y uso de pigmentos del grano del maíz (*Zea mays* L) como colorantes en yogurt. *ALAN.* 2005; 55(3).
24. Williams RO. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol.* 1998;114(3):330-2.
25. Ishikawa T, Nishigaki F, Miyata S, Hirayama Y, Minoura K, Imanishi J, Neya M, Mizutani T, Imamura Y, Ohkubo Y, Mutoh S. Prevention of progressive joint destruction in adjuvant induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR217840. *Eur J Pharmacol.* 2005;515(1-3):188.
26. Yu Y, Xiong Z, Lv Y, Qian Y, Jiang S, Tian Y. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. *Skeletal Radiol.* 2006 Mar;35(3):156-64.

27. Kawai S, Nagai K, Nishida S, Sakyo K, Murai E, Mizushima Y. Low-dose pulse methotrexate inhibits articular destruction of adjuvant arthritis in rats. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(2):213-5.
28. Gantet P, Memelink J. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(12):563-9.
29. Azevedo A. *Plantas Medicinales en Atención Primaria de la Salud OMS/OPS.* 2003.
30. Biocomercio [sede web]. Lima: Biocomercio Perú-Ficha técnica 16-Antocianinas; 2007 [acceso 13 de enero del 2008]. Ficha técnica: antocianinas. Disponible en: <http://www.biocomercioperu.org/fichatecnica16.htm>
31. He YH, Zhou J, Wang YS, Xiao C, Tong Y, Tang JC, Chan AS, Lu AP. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of cherries on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Scand J Rheumatol.* 2006;35(5):356-8.
32. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18(10):872-9.
33. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000;148(2-3):187-97
34. Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22(12):1117-20.
35. Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamano S, Kadota T, Koda T, Nakamura M, Imaida K, Ito N, Shirai T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 2001;171(1):17-25.
36. Jing P, Noriega V, Schwartz SJ, Giusti MM. Effects of growing conditions on purple corn cob (*Zea mays L.*) anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 2007;55(21):8625-9.
37. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2005;38(11):981-6.
38. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R380-91

39. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2007;40(3-4):167-71.
40. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002. 82: 47–95
41. Yamada K, Nakamura T, Utsumi H. Enhanced intraarticular free radical reactions in adjuvant arthritis rats. *Free Radic Res.* 2006;40(5):455-60.
42. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2005;38(11):981-6.
43. Remans P, van Osterhout M, Smeets T, Sanders M, Frederiks W, Reedquist K, Tak P, Breedveld F, van Laar J. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2003-9.
44. Regan E. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2005; 52(11): 3479
45. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta.* 2003;338(1-2):123-9
46. Tsuda T, Kato Y, Osawa T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett.* 2000;484(3):207-10.
47. Tsuda T, Horio F, Kitoh J, Osawa T. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch Biochem Biophys.* 1999;368(2):361-6.
48. Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 2003; 64: 923–33.
49. Kuno N, Mizutani T. Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(16):1431-44.
50. Kowalczyk E, Krzesiński P, Kura M, Szmigiel B, Błaszczak J. Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55(5):699-702.
51. Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod.* 1999;62(2):294-6.
52. Kim AJ, Park S. Mulberry extract supplements ameliorate the inflammation-related hematological parameters in carrageenan-induced arthritic rats. *J Med Food.* 2006 Fall;9(3):431-5.

53. Close B, Banister K, Baumans V., Bernoth E, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, et al. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación. *Lab Animal*. 1997; 31, 1-32
54. Kalin R, Righi A, Del Rosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic Res*. 2002;36(8):819-25.
55. Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Kjølrsrud-Bøhn S, Sandvik L, Blomhoff R. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr*. 2007;137(8):1951-4.
56. Toledo de Oliveira T, Nagem T, Rocha Da Costa M, Marciano Da Costa I, Magalhães N, Stringheta P, Queiroga De Lima e, Kling De Moraes G, Da Silva Vieira H. Biological properties of natural dyes. *Ars Pharmaceutica*. 2004;45(1): 5-20.
57. Hamilton JA. Hypothesis: in vitro evidence for the invasive and tumor-like properties of the rheumatoid pannus. *J Rheumatol*. 1983;10(6):845-51.