



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Evaluación del efecto anti-inflamatorio de compuestos
kauranos extraídos de plantas del género *Croton*.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por el bachiller Rico Gustavo
como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutor(es): Dr. Juan De Sanctis (IDI)

Dra. Elizabeth Valdivieso (IBE)

Caracas – Venezuela

Mayo - 2010

A Mis padres Gustavo y Gladys por tener la confianza y la paciencia, sin ellos no hubiese sido posible; a mi abuela que siempre me ha dado apoyo y cariño, a mis hermanos (as) que han creído en mi y sobretodo a Dios que me acompaña siempre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universidad Central de Venezuela por brindarme una educación de excelente calidad y por permitirme conocer a mis profesores que me enseñaron a valorar la Biología como un estilo de vida.

Al Instituto de Inmunología (IDI) por financiar mi proyecto de tesis y por permitirme trabajar en un ambiente multi-disciplinario y de abundante conocimiento científico.

Al Dr. Juan De Sanctis por ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis, por su confianza y sus consejos en el momento oportuno.

A la Dra. Alirica Suárez (Facultad de Farmacia) por los compuestos usados en esta tesis, ya que salieron de su laboratorio y por todas sus enseñanzas del mundo de la química y farmacia.

Al Profesor Michael Mijares por su entrenamiento y seguimiento en el desarrollo de la parte experimental de mi tesis.

A la profesora Gricelis Martínez que me ayudo en todo momento con mucho entusiasmo.

A la Licenciada Perla Chirinos porque con su duro trabajo y ayuda desinteresada despertó en mí la voluntad de querer aprender siempre un poquito más y superarme.

A todos mis amigos y amigas Ana María, Irene, Dariana, Marilin, Jaylin, Melina y Jesús por su continuo apoyo y ánimo en los momentos más difíciles y en definitiva por darme su amistad y cariño en todo momento.

A mi madre Gladys y a mi Padre Gustavo porque me dieron la vida y enseñarme a apreciarla, luchar y seguir siempre hacia delante, y por su paciencia en mis años de estudio.

A mi familia que me han apoyado incondicionalmente, a mis hermanos (as) y sobrinos (as) por entenderme todo este tiempo de dedicación a crecer profesionalmente.

ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
1. La inflamación.....	3
2. Comienzo del proceso inflamatorio.....	6
3. Activación de células inflamatorias: leucocitos y macrófagos.....	6
4. Mediadores de la respuesta inflamatoria: especies reactivas de oxígeno y Nitrógeno.....	9
4.1. Especies reactivas de oxígeno.....	10
4.2. Especies reactivas de nitrógeno.....	13
III. Antecedentes.....	16
1. Productos naturales usados en la inflamación.....	16
2. Productos naturales de origen vegetal.....	16
4. Metabolitos aislados de las plantas del género <i>Croton</i>	18
5. Compuestos Kauranos a evaluar: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine.....	19
IV. Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
V. Materiales y Métodos.....	23
1. Preparación de reactivos.....	23
1.1. Preparación de los medios de cultivo suplementados (RPMI y Dulbecco).....	23
1.2. Preparación del buffer salino fosfato suplementado (PBS gel).....	23
1.4. Preparación de la solución de lisis.....	23
1.5. Preparación de las soluciones de los compuestos.....	23
2. Cultivos celulares.....	24
3. Purificación de leucocitos humanos.....	24
4. Conteo, observación y determinación de viabilidad de las poblaciones celulares por marcaje con azul de tripano.....	25
5. Determinación del efecto de compuestos kauranos sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 (Método de Griess).....	25
6. Ensayo de viabilidad celular: Reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	27
7. Actividad captadora del radical óxido nítrico (NPS).....	27
8. Método de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT).....	28
9. Ensayo de la capacidad oxidativa: Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelular por citometría de flujo.....	29
10. Determinación del potencial de captación de radicales libres mediante el uso de DPPH.....	30
11. Ensayo de proliferación por citometría de flujo.....	31
12. Estadística.....	32
VI. Resultados.....	34
VII. Discusión.....	57
VII. Conclusiones.....	60
IX. Bibliografía.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPc: Adenosina mono fosfato cíclico.

ANOVA: Análisis de varianza de una vía.

AP-1: Proteína activadora 1.

ARN: Ácido ribonucleico.

Bcl-2: Proteína anti-apoptótica 2.

BLP: Lipoproteína bacterial.

CFSE-DA: Carboxifluoresceína

succinimidil ester diacetato.

c-IAP: Proteína inhibidora de apoptosis
celular.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CREB: Elemento de unión de respuesta al
AMPc.

D.O.: Densidad óptica.

DAG: Diacilglicerol.

DCF: Diclorofluoresceína.

DCFH: Diclorodihidrofluoresceína.

DCFH-DA: Diacetato de 2,7-
diclorodihidrofluoresceína.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPPH: 1,1-difenil-2-picrylidrazil.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado
a enzimas.

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial.

ERK: Proteína quinasa relacionada a
señales extracelulares.

H2DCF-DA: Diacetato de 2,7-
diclorodihidrofluoresceína.

IC₅₀: Concentración media (50%)
máxima inhibitoria de una sustancia.

ICAM-1: Moléculas de adhesión
intracelular 1.

ICAM-2: Moléculas de adhesión
intracelular 2.

IL-1: Interleucina 1. Citocinas
proinflamatorias.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible.

I κ B: Proteínas inhibidoras del factor
nuclear kappa B.

I κ B α : Proteínas inhibidoras del factor nuclear kappa B α .

I κ B β : Proteínas inhibidoras del factor nuclear kappa B β .

I κ B ϵ : Proteínas inhibidoras del factor nuclear kappa B ϵ .

KOH: Hidróxido de potasio.

LAM: Lipoarabinomanano.

LPS: Lipopolisacáridos bacterianos.

LTA: Ácido lipotéico.

MAP3K: Proteína quinasa de la quinasa de la quinasa activada por mitógenos.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MCP1: Proteínas quimiotácticas aceptadoras de metil.

MEK: Proteína quinasa de la quinasa activada por mitógenos.

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos alfa.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NBT: Azul de nitrotetrazolio.

NEMO: Proteína moduladora esencial del factor nuclear kappa B.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

nNOS: Sintasa de óxido nítrico neuronal.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Sintasa de óxido nítrico.

NOS1: Sintasa de óxido nítrico neuronal.

NOS2: Sintasa de óxido nítrico inducible.

NOS3: Sintasa de óxido nítrico endotelial.

NPS: Nitroprusiato de sodio.

PAF: Factor activador de plaquetas.

PAMP: Patrones moleculares invariables asociados a patógenos.

PBS: Buffer salino fosfato

PGI₂: Prostaciclina.

PGN: Péptidoglucanos.

PKB: Proteína quinasa B.

PKC: Proteína quinasa C.

PLA₂: Fosfolipasa A₂.

PMA: Forbol 12-miristrato 13-acetato.

PMN: Población de polimorfonucleares extraídos de sangre total.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones moleculares.

RANTES: Quimiocinas reguladas por activación y secretadas por células T.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

S.D.: Desviación estándar.

sLex: Ácidos de Lewis.

SOD: Superóxido dismutasa.

TLR: Receptores de señalización (Tolllike receptor).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TpI2: Proteína quinasa de la quinasa de la quinasa activada por mitógenos.

TRAF: Factor asociado al receptor de factor de necrosis tumoral.

VCAM-I: Molécula de adhesión celular vascular

RESUMEN

Los productos naturales pueden definirse como una sustancia química que esta presente o es producida por un organismo vivo. Muchos de los compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación, son obtenidos de los extractos de plantas y otros organismos; y éstos incluyen diversos compuestos como fenoles, terpenoides, alcaloides, esteroides, glicósidos y carbohidratos. Bajo esta premisa el **objetivo** de este trabajo es estudiar el efecto antiinflamatorio de los compuestos extraídos de plantas del género *Croton*: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre leucocitos humanos y macrófagos múridos Raw 264.7.

Para esto se aplicaron las siguientes técnicas y **metodologías**: determinación del efecto de compuestos kauranos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos múridos RAW 264.7 (método de Griess), los ensayos de viabilidad celular por el método de reducción de MTT, la actividad captadora del radical óxido nítrico (NPS) por parte de los compuestos, el método de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) para cuantificar la variación en la producción de anión superóxido involucrada en la cascada de reacciones pro-inflamatorias inducida por el PMA en leucocitos humanos, el ensayo de la capacidad oxidativa por citometría de flujo, la determinación del potencial de captación de radicales libres mediante el uso de DPPH y finalmente el ensayo de proliferación por citometría de flujo. Lo que representa los ensayos iniciales para cada compuesto, y el punto de partida para estudios posteriores de su posible aplicación como fármacos.

Como resultados y **conclusión**, los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, tienen una potencial actividad anti-inflamatoria debido a que: disminuyen la viabilidad sobre las líneas celulares leucémicas, y no afectan la viabilidad de los leucocitos humanos. En macrófagos múridos RAW 264.7 inhiben la cantidad de nitritos producidos; los compuestos Micanol y Deoxo-geayine son capaces de inhibir la producción de anión superóxido en leucocitos humanos estimulados con PMA, y por último estos compuestos tienen efectos directos sobre las células induciendo cambios en el patrón de producción de radicales, viabilidad y proliferación celular.

Palabras Claves: Kauranos, Euphorbiaceae, Inflamación, anticanceroso, citotoxicidad, antitumoral, terpeno, diterpeno, flavonoide.

1. La inflamación.

La importancia de la reacción inflamatoria se justifica porque en casi 2/3 de la totalidad de las enfermedades intervienen mecanismos patogénicos propios de la respuesta inflamatoria. De allí, que la industria farmacéutica se interese en la búsqueda de productos naturales bioactivos que sirvan de fuente para la producción de nuevos fármacos. Una alianza entre los sistemas biológicos y los experimentales puede ser una poderosa herramienta para una intervención segura y efectiva contra las enfermedades autoinmunes.

La inflamación es una respuesta celular y tisular compleja. Durante el primer siglo A.D. Celsus, definió macroscópicamente la inflamación con cuatro signos cardinales: *rubor* referido al enrojecimiento en el área afectada; *calor* para referirse al aumento de la temperatura; *dolor* como consecuencia de la presión ejercida por la acumulación de fluidos, por la afectación de nervios y por la acción de algunos de los mediadores químicos y finalmente por *tumor* para indicar la hinchazón. Todos tradicionalmente usados, aun en la actualidad, como criterio para describir la inflamación, asimismo todos estos signos reflejan el efecto de las Citocinas (proteínas reguladoras) y otros mediadores inflamatorios en los vasos sanguíneos locales (Janeway y col., 2005).

En el transcurso de la inflamación, ocurre un incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos permitiendo el flujo de una gran cantidad de células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) que son capaces de liberar citocinas, quimiocinas, proteínas de la cascada de complemento y de la cascada de coagulación (Solomon, 1996). Las citocinas y los fragmentos del sistema del complemento tienen efectos en las propiedades adhesivas del endotelio, causando que los leucocitos polimorfonucleares circundantes se fijen a las

células endoteliales de los vasos sanguíneos y migren entre ellos al sitio de la infección. El principal tipo celular visto en una respuesta inflamatoria en sus fases iniciales son los neutrófilos (Janeway y col., 2005).

2. Comienzo del proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es una respuesta vital ante una lesión, infección, traumatismo, y otros daños al tejido. Algunos de los mediadores liberados por los leucocitos extravasculares, como triptasas y otras proteasas, histamina, eicosanoides, citocinas e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS (por sus siglas en inglés) respectivamente) causan la vasodilatación de los vasos sanguíneos (Nathan, 2002). También la vasodilatación local es favorecida por los neurotransmisores liberados cuando se activan la terminaciones nerviosas (Kovacs, 2003).

Asimismo, la respuesta inflamatoria es activada cuando sus moduladores entran en contacto los componentes de la pared celular de las bacterias gram-negativas y gram-positivas como también los constituyentes de las levaduras, virus o componentes de la necrosis tisular, y pueden activar directamente la cascada del complemento bien sea por la ruta clásica o por la alternativa (Stöve y col., 1996).

La principal propiedad del sistema del complemento, brazo efector de la inmunidad humoral, se le puede atribuir a las anafilotoxinas (AT) C3a, C4a, y C5a, estos polipéptidos son generados después de la proteólisis de las cadenas de C3, C4 o C5, que interactúan con receptores específicos en las células mieloides, como leucocitos o macrófagos, resultando la expresión de moléculas de adhesión CD11/CD18 de la familia de las integrinas. Otra actividad biológica de C5a es atribuida a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), enzimas lisosomales, liberación de histamina, liberación de los

mastocitos y basófilos, la producción de citocinas quimiotácticas y el incremento de la permeabilidad vascular (Stöve y col., 1996).

Cuando los macrófagos son activados inician la producción de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 β) la cual aumenta el flujo local sanguíneo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que está implicado en el mantenimiento y la homeostasis del sistema inmune (Balkwill, 2006) y que también aumenta la expresión de moléculas de adhesión. También participan: la interleucina 6 (IL-6) que promueve la diferenciación de monocitos, la interleucina 4 (IL-4) relacionada a la inflamación alérgica, la interleucina 8 (IL-8) participa en la quimioatracción de los neutrófilos, por último el interferón gamma (IFN- γ) que juega su papel en la función inmunitaria celular contra microbios intracelulares. La función de estas citocinas, también llamadas “citocinas de respuesta temprana” es estimular las células endoteliales vasculares a expresar moléculas de adhesión vascular, como las moléculas de adhesión intercelular -1 y -2 (ICAM-1 e ICAM-2), y las selectinas E y P, con firme adhesión de los neutrófilos al endotelio que se unen a las integrinas CD11/CD18 activadas en los leucocitos (Ward y Lentsch, 1999). Las E-selectinas y P-selectinas reconocen los ácidos de Lewis (sLex) presentes en neutrófilos, monocitos y algunos linfocitos y producen una adhesión reversible de dichas células a la pared vascular, proceso conocido como rodamiento (Janeway y col., 2005). El rodamiento (ó cascada de adhesión) de leucocitos es una secuencia de la adhesión y activación de eventos que finaliza con la extravasación de leucocitos, donde la célula ejerce sus efectos en el sitio inflamado. El tráfico de leucocitos de los vasos sanguíneos en los sitios de inflamación es un proceso de cooperación múltiple, el primer evento que la interacción de leucocitos con la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos acompañada

de la migración a lo largo de la pared del vaso, que está mediada por la familia de moléculas de adhesión (Ushakova y col., 2005).

Al menos existen cuatro pasos de la cascada de adhesión, captura, activación, firme adhesión y transmigración. Cada uno de estos pasos parece ser necesario para la eficacia de reclutamiento de leucocitos, ya que el bloqueo de cualquiera de los cinco puede seriamente reducir la acumulación de leucocitos en el tejido (Pochechueva y col., 2004). Estas medidas no son en las fases de inflamación, sino que representan la secuencia de los acontecimientos desde la perspectiva de cada uno de los leucocitos. En un momento dado, sucede la captura, luego la activación, la adherencia firme y la transmigración, todo esto en paralelo, con la participación de los distintos leucocitos en el mismo vaso (**Figura 1**) (Luster y Tager, 2004).

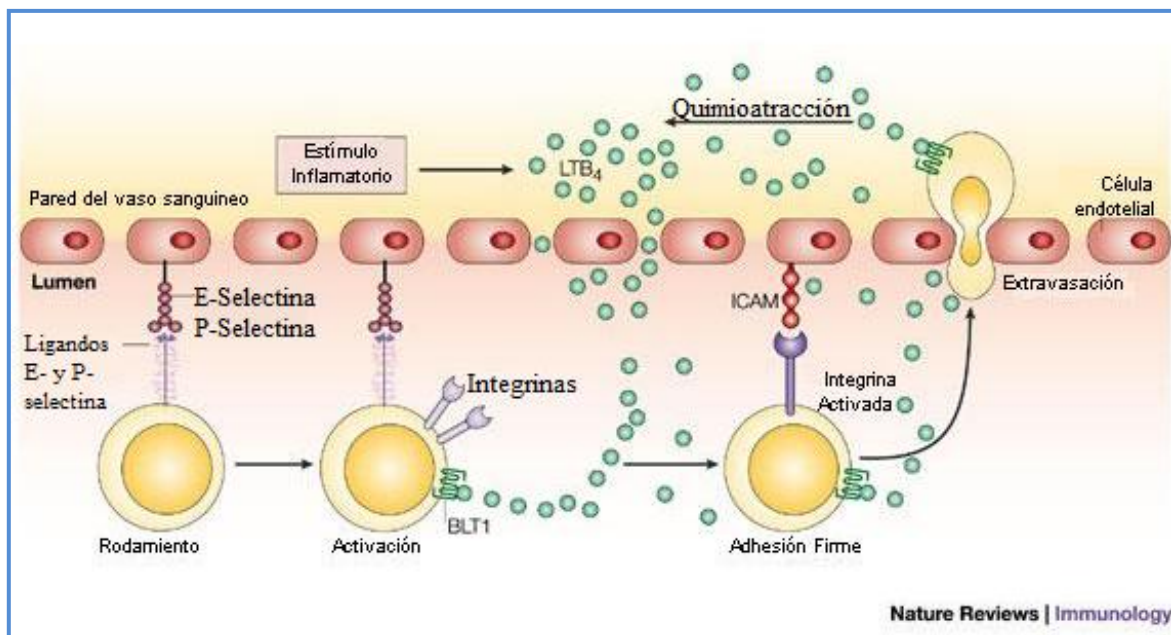


Figura 1. Iniciación del proceso inflamatorio. Los neutrófilos que se encuentran en los vasos (o capilares), migran a los sitios de infección en un proceso de varios pasos, mediado por interacciones adhesivas. Estas interacciones son reguladas por citocinas y quimiocinas derivadas de los macrófagos activados en los tejidos lesionados (Modificado de http://www.nature.com/nri/journal/v4/n9/fig_tab/nri1438_F3.html).

3. Activación de células inflamatorias: leucocitos y macrófagos.

Los sensores del sistema inmune innato son receptores que reconocen patrones moleculares conservados (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP de sus siglas en inglés *Pathogen-associated molecular patterns*) de microorganismos, indispensables para la supervivencia de estos. La inducción de la inmunidad adaptativa se logra gracias a la activación de moléculas en la superficie celular de las células efectoras del sistema inmune innato. Estas células conocidas como receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR, de sus siglas en inglés *pattern recognition receptors*), median la ingestión del microbio por parte del macrófago para que se inicie su procesamiento y generan señales que conducen a la expresión de genes que codifican moléculas co-estimuladoras para que la presentación antigénica desencadene una respuesta inflamatoria efectiva (Mora y Corado, 2003).

El lipopolisacárido bacteriano (LPS, de sus siglas en inglés *Lipopolysaccharide*) es el prototipo de PAMPs, asimismo que el ácido lipotéico (LTA, de sus siglas en inglés *lipoteic acid*) para las bacterias Gram positivas, los peptidoglucanos (PGN, del inglés *Peptidoglicans*), lipoarabinomanano (LAM, del inglés *lipoarabinomanan*), lipoproteína bacteriana (BLP, del inglés *bacterial lipoproteic*), variantes de ácido nucleico en caso de virus, son otros ejemplos de estos patrones moleculares conservados (PAMPs) (Fraser y col., 1998; Zhang y Ghosh, 2001).

Dos importantes miembros de este grupo de receptores (PRR) que se expresan en macrófagos, son el CD14 (de sus siglas en inglés *cluster of differentiation 14*) y el receptor de tipo Toll (TLR, de sus siglas en inglés *Toll-like receptors*), que son esenciales para la respuesta inmune innata a los componentes de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas,

micobacterias, espiroquetas y levadura. Estos son específicos y se unen directamente a los patógenos.

El receptor de tipo Toll 4 (TLR4, del inglés *Toll-like receptors 4*) es el miembro de la familia Toll que primero se identificó en mamíferos y el que mejor se ha caracterizado forma parte del receptor multimerico del LPS en monocitos humanos. El LPS es uno de los principales componentes de la superficie externa de bacterias gram-negativas y constituye un potente activador de células de los sistemas inmune e inflamatorio incluyendo macrófagos, monocitos y células endoteliales (Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2003). Debido a esto la estimulación con LPS sirve como adyuvante de la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras, de allí que esta molécula sea utilizada ampliamente en el estudio de procesos inflamatorios (Janeway y col., 2005).

Al lipopolisacárido (LPS) se le denomina endotoxina, está conformado por un lípido A, el cual es la porción tóxica, ya que está inmerso en el centro de la membrana por ende sólo ejerce sus efectos tóxicos cuando la célula es lisada, ya sea por ataque del complemento y fagocitosis, o por lisis celular como consecuencia de la acción de antibióticos. Este lípido A, se une covalentemente al núcleo polisacárido (*core* o región R), constituido por el conjunto de unas hexosas y monosacáridos llamados dideoxiazúcares. El *core* está unido al antígeno O, formado por una serie de cuatro azúcares que se repiten (específicos de cada bacteria) (Bermejo y Duarte, 2003) (**Figura 2**)

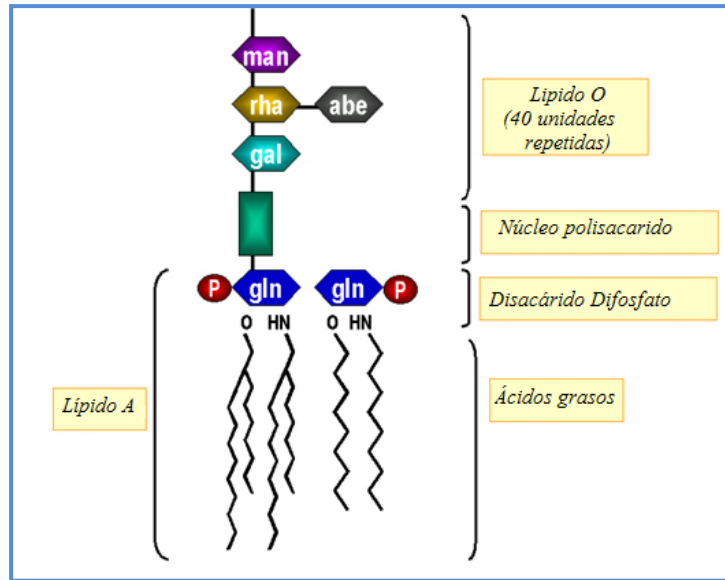


Figura 2. Estructura del lipopolisacárido bacteriano (LPS). (Modificado de <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/lps.jpg>)

Los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, se encargan de eliminar a los patógenos y partículas extrañas que entran al cuerpo mediante la fagocitosis y más específicamente a través de la explosión respiratoria, en la cual se producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales libres y aniones superóxido, que son útiles en la degradación de dichas partículas y patógenos fagocitados. Las ROS son activadas por interleucina-5, factor C5a, leucotrieno B4, PAF, complejo de inmunoglobulinas G y A, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), entre otros (Ezeamuzie y Talism, 2006).

El PMA es un activador de la proteína quinasa C (PKC) y su importancia radica en que posee un dominio de acción similar al del diacilglicerol (DAG, es una molécula del espacio intracelular que actúa como mediador de comunicación celular) y puede mimetizar los efectos de este último como molécula señalizadora en la ruta de la fosfolipasa C

utilizada por activadores fisiológicos como C5a y PAF (Ezeamuzie y Talism, 2006). De allí, que el PMA es un activador no natural que ha sido ampliamente empleado en el estudio de estos mecanismos de señalización que involucran a la PKC y por ende, un potente estimulador de la producción de ROS en las células. Este compuesto también es capaz de estimular la producción intracelular de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico, el cual es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos.) (Ezeamuzie y Taslim, 2006). (**Figura 3**)

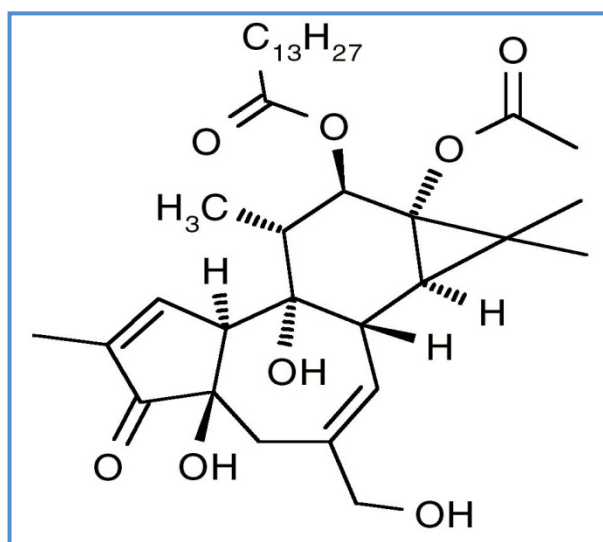


Figura 3. Estructura del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). (Tomado de <http://www.lclabs.com/PROFILE/P-R/P-1680.php4>)

4. Mediadores de la respuesta inflamatoria: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Para protegerse del desafío oxidativo, las células han desarrollado mecanismos de defensa que garantizan un equilibrio adecuado entre moléculas pro- y antioxidantes. Bajo condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio homeostático entre la formación de

especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) y su remoción, por compuestos antioxidantes endógenos (Asehnoune y col, 2004).

Durante la respuesta inflamatoria, las células fagocíticas; neutrófilos, macrófagos y monocitos, al ser activados pueden generar compuestos oxidantes que les ayudan a eliminar los microbios fagocitados o que estén en el ambiente extracelular. Algunos de estos compuestos conocidos como mediadores inflamatorios y que incluyen especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) y de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*), tienen efectos que contribuyen no sólo a la eliminación directa de patógenos, sino que contribuyen con el progreso del proceso inflamatorio pudiendo llegar a producir daños al tejido circundante. Esto se debe a que, son producidos por enzimas inducibles, que no se encuentran activadas en células normales, y que producen grandes cantidades de estos productos (Asehnoune y col., 2004).

4.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS).

La generación de las ROS depende principalmente en la actividad de la membrana, del complejo enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, del inglés *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)-oxidasa y la mieloperoxidasa (MPO) del sistema. Dicho sistema funcional facilita la transferencia de un electrón citosólico NADPH-oxidasa al oxígeno molecular para producir anión superóxido (O_2^-). Las citocinas bioactivas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*), están implicados en la regulación de la actividad NADPH-oxidasa en linfocitos polimorfonucleares. TNF- α conduce al proceso de degranulación (liberación de histamina) (Rysz y col., 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se producen en las células aeróbicas, ya sea como subproductos durante el transporte de electrones mitocondrial, por varias oxidorreductasas o por oxidaciones de metabolitos. También se ha determinado que estas especies participan en la señalización celular (Forman y Torres, 2002).

De las ROS producidas en los tejidos, el H_2O_2 actualmente parece ser la especie más importante en términos de señalización. Esta molécula es capaz de activar respuestas diversas y específicas en la célula proporcionando un mecanismo coherente con un papel fundamental en la señalización redox (Forman y Torres, 2002). Se ha demostrado que ésta especie está involucrada en la activación de quinasas intracelulares, incluidas MAPKs, PKC y proteínas quinasas B (PKB), gracias a que es inducida por la interacción de factores de crecimiento y citocinas, con sus receptores (Strassheim y col., 2004).

El superóxido por su parte, es producido por diversas vías, que incluyen la respiración celular normal, leucocitos polimorfonucleares activados, células endoteliales y el flujo de electrones a nivel mitocondrial. Bajo condiciones fisiológicas la reactividad biológica de este radical está controlada por la superóxido dismutasa (SOD), pero durante inflamaciones agudas o crónicas éste es producido a tasas que superan la capacidad de este sistema de defensa, resultando en daños mediados por este radical. Algunas de las funciones del superóxido incluyen daño de las células endoteliales e incremento en la permeabilidad microvascular, incremento en moléculas de adhesión como ICAM-1 y P-selectinas, destrucción autocatalítica de neurotransmisores y hormonas, peroxidación lipídica (el cual es bien conocido como daño oxidativo de los lípidos debido a radicales libres, según Di Giulio en 1991) y oxidación. También es capaz de activar factores de

transcripción como el factor de activación nuclear NF-κB y la proteína activadora-1 (AP-1), que regulan varios genes pro-inflamatorios (Salvemini y col., 2006).

Hay diversos mecanismos por los cuales los fagocitos activados producen agentes oxidantes; uno de ellos es mediante la oxidasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esta enzima cataliza la oxidación del NADPH en presencia de oxígeno, y los electrones liberados interactúan con oxígeno molecular causando su reducción, formando anión superóxido (O_2^-). Una nueva adición de electrones al anión O_2^- lo convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede ser reducido al más activo de los radicales de oxígeno, el radical hidroxilo (HO^\cdot) (**Figura 4**) (Ward y Lentsch, 1999; Janeway y col., 2005).

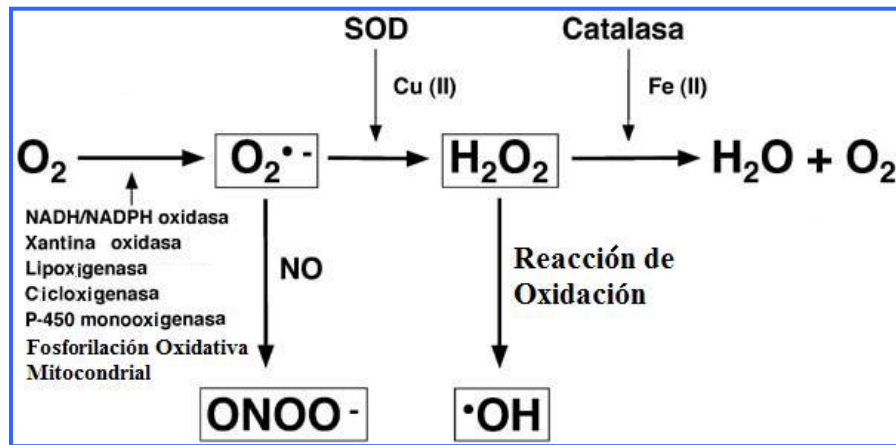


Figura 4. Mecanismos de producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS). (Nomenclatura: O_2^- radical anión superóxido; H_2O_2 peróxido de hidrógeno; OH^\cdot radical hidroxilo; $ONOO^-$ peroxinitrito; SOD, superóxido dismutasa) (Tomado y modificado de www.chinaphar.com/1671-4083/25/figs/977f1.jpg).

4.2. Especies reactivas de nitrógeno.

Asimismo, el óxido nítrico (NO) es un radical libre, de vida corta que participa en diversos procesos biológicos, como la regulación de los vasos sanguíneos, la inflamación, la neurotransmisión, y de la apoptosis. NO es ampliamente utilizado como una molécula de señalización en las células por todo el cuerpo, llevando a cabo numerosas funciones, pero sobre todo la regulación de tono vascular y el flujo de sangre local. En general el NO causa vasodilatación local y el aumento de suministro de oxígeno. (Nagy y col., 2007). El NO se sintetiza a partir de L-arginina en una reacción catalizada por una familia de enzimas óxido nítrico sintetasa (NOS). La enzima NOS activa es un tetrámero formado por dos proteínas NOS calmodulina y dos moléculas. La conversión de L-arginina a NO y L-citrulina también requiere NADPH y O₂ como cosustrato y (6R)-tetrahidrobiopterina (BH₄), FAD, FMN y hierro protoporfirina IX como cofactores (Korhonen y col., 2005).

Existen 3 isoformas de la oxido nítrico sintasa (NOS), siendo tanto la isoforma endotelial (eNOS) también conocida como tipo III (NOS3), como la isoforma neuronal (nNOS) también denominada tipo I (NOS1), ambas calcio-dependiente y se expresan constitutivamente (cNOS). Dichas isoformas median la producción de NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular (Moncada y col., 1997) **(Figura 5)**.

La otra isoforma es la inducible (iNOS) conocida también como de tipo II (NOS2), es calcio-independiente, en la cual su expresión puede ser inducida, en células como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio; la inducción se produce como respuesta a diferentes estímulos tales como el interferón gamma (IFN- α), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Esta isoforma se

sintetiza de *novo* al ser estimuladas las células y cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares (Moncada y col., 1997).

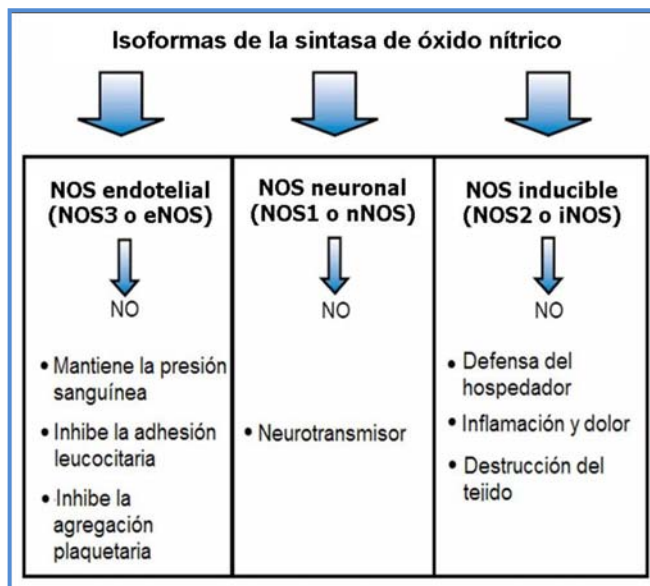


Figura 5. Isoformas de la sintasa de óxido nítrico. (Modificado de Abramson y col., 2001).

El óxido nítrico reacciona de forma rápida con el superóxido (O_2^-) y es convertido en anión peroxinitrito ($ONOO^-$), que es altamente reactivo con grupos tiol y formando además especies tóxicas. Por último, el anión peroxinitrito es metabolizado a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), que son productos estables y que sirven como marcadores convenientes cuantitativos de óxido nítrico (**Figura 6**) (Ward y Lentsch, 1999).

Por ello, la cuantificación de los radicales de oxígeno y nitrógeno son importantes para entender los elementos iniciales del proceso inflamatorio.

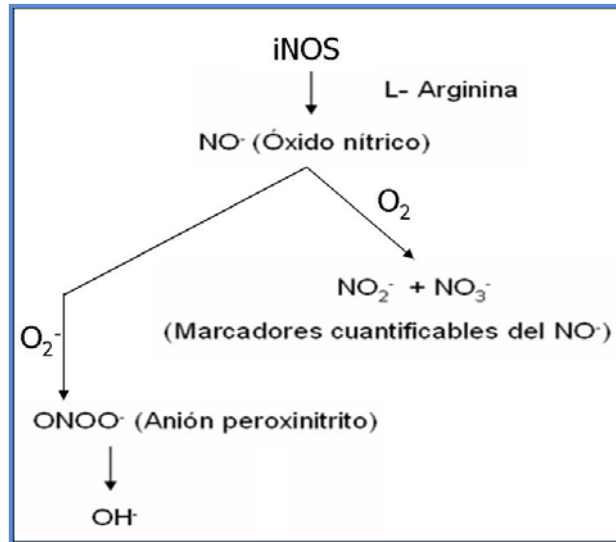


Figura 6. Mecanismos de producción de oxidantes por células fagocíticas activadas. (Modificado de Ward y Lentsch, 1999).

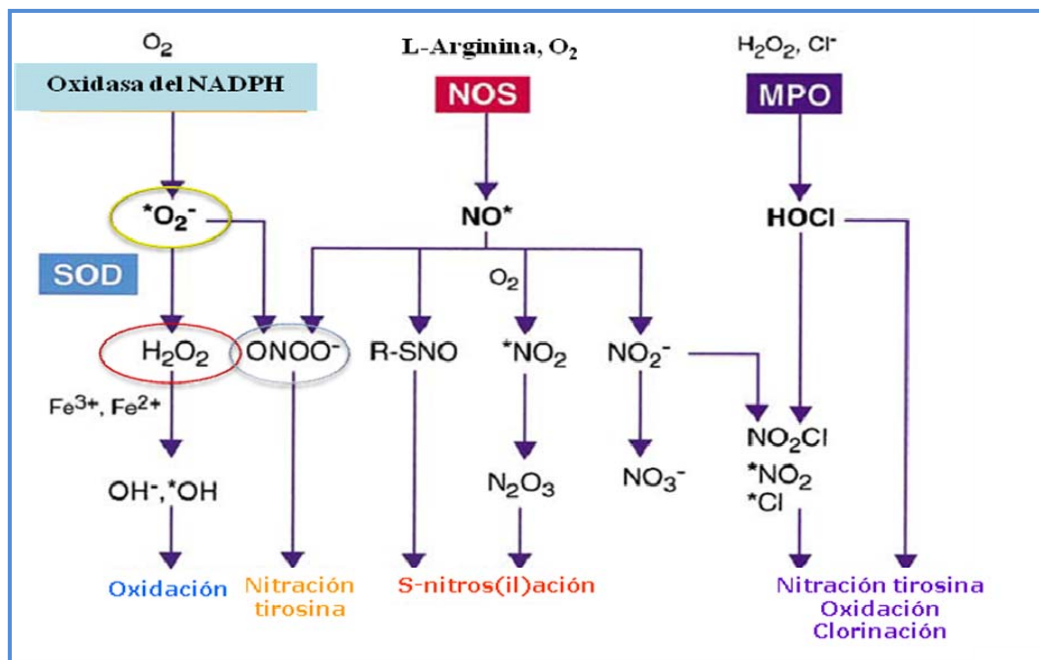


Figura 7. Esquema general del metabolismo de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno por células inflamatorias. NOS= Sintasa de NO MPO = Mieloperoxidasa SOD = Superóxido dismutasa. (Modificado de Folkerts, 2001)

1. Productos naturales usados en la inflamación.

Los productos naturales han sido de incalculable valor como herramientas para descifrar la lógica de la biosíntesis y como plataformas para el desarrollo de fármacos de primera línea (Clardy y Walsh, 2004). Los productos naturales pueden definirse como una sustancia química que esta presente o es producida por un organismo vivo. Este término se utiliza comúnmente en referencia a las sustancias químicas que se encuentran en la naturaleza y que tienen efectos farmacológicos distintivo. Para su uso como medicamento, estas sustancias deben ser probadas tanto en animales como humanos, demostrando su inocuidad. Entonces, se destinan a la administración al hombre o a los animales, con fines de curación, atenuación, tratamiento y prevención de ciertas enfermedades o sus síntomas (Ríos y col., 2004).

Muchos de los compuestos utilizados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación, son obtenidos de los extractos acuosos de plantas y otros organismos; y éstos incluyen diversos químicos naturales como fenoles, terpenoides, alcaloides, esteroides, glicósidos y carbohidratos. Sin embargo, la complejidad de muchos productos naturales puede limitar el alcance de las modificaciones químicas para optimizar su uso terapéutico (Clardy y Walsh, 2004).

2. Metabolitos aislados de origen vegetal.

Entre las sustancias con actividad biológica, los terpenoides son el grupo de compuestos aleloquímicos más importante y prometedor ya que se encuentran en cantidades apreciables en plantas de diversas familias, es el grupo que presenta una mayor diversidad estructural e incluye aceites esenciales, resinas, fitoesteroides, piretrinas de origen natural y saponinas (Caballero, 2004).

Los terpenoides son compuestos formados por unidades de isopreno. Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (isopentenilpirofosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico. Este es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante (Goodwin, 1971). Entre los diterpenos, se han conseguido hasta diez compuestos antiinflamatorios, mientras que los sesterterpenoides (compuestos tipo manoalida, tipo scalaradial y tipo cacospongionólidos) poseen en su mayoría efecto sobre la fosfolipasa A2 (Keizers y Davies-Coleman, 2005).

La síntesis de los diterpenoides se realiza por dos vías: vía acetil CoA o vía del acetato mevalonato; en ambas, el precursor isopentenil PP representa la unidad isoprénica base de los compuestos. Luego continuará la síntesis con las formaciones sucesivas de geranil PP, farnesil PP y geranil geranil PP. Éste último compuesto, se cicliza para formar el ent-kaureno o kaureno. Por acción de monoxigenasas (citocromo P450), el C19 del ent-kaureno es oxidado a alcohol (ent-kaurenol), seguidamente a aldehído (ent-kaurenal) y para finalizar a ácido (ácido ent-kaurenoico), a nivel de la membrana del retículo endoplásmico. En un paso posterior, el anillo B se contrae por expulsión del C7 pasando de un anillo de 6 carbonos a otro de 5, formando el gibano, luego por oxidación en C7 se forma el GA12 aldehído (**Figura 8**) (Soberón y col., 2000), compuesto cuya estructura es similar a la del compuesto a evaluar conocido como Micanol.

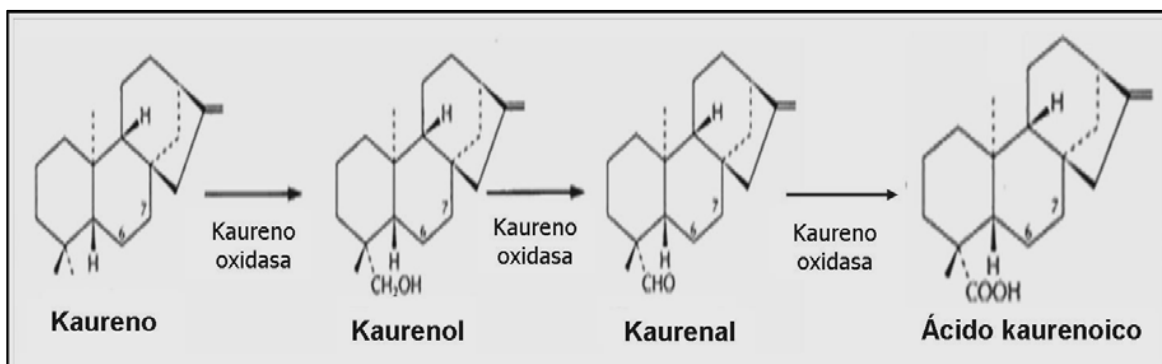


Figura 8. Biosíntesis de diterpenoides. (Modificado de Soberón y col., 2000).

La quercetina (nomenclatura IUPAC: 2-(3,4- dihydroxyphenyl)- 3,5,7- trihydroxy- 4H- chromen- 4-one) es un potente antioxidante debido a que puede quelar los iones metálicos, y muy importante posee la capacidad de capturar los radicales libres de oxígeno (Bors y col., 1990). Este compuesto polifenólico y bioflavonoide es importante en la dieta humana, tiene propiedades anti-inflamatorias (Stewart y col., 2008).

3. Metabolitos aislados de plantas del genero *Croton*.

Las plantas del género *Croton*, familia de las Euphorbiaceae, han sido usados como plantas medicinales en la cultura folklórica de los pueblos indígenas venezolanos, en tratamientos antiinflamatorios, para molestias gastrointestinales, y como analgésicos (Suárez y col., 2006). Dentro de este género existen especies como la *Croton cuneatus* y *Croton malambo* que han sido estudiadas por la Dra. Suárez y col., 2006 demostrándose su acción como antiinflamatorios. Asimismo, de exudados resinosos extraídos de la especie *Croton cuneatus*, se han identificado hasta 30 compuestos presentes (Suárez y col., 2003).

Extractos acuosos de esta planta mostraron en dosis de 7 mg/kg un significativo efecto antiinflamatorio en comparación con drogas no esteroides como el ketoprofeno, el diclofenaco sódico y AAS (ácido acetilsalicílico) (Suárez y col., 2006). El análisis de aceites esenciales de *C. malambo* mostró la composición de 36 constituyentes incluidas trazas, en la que el metil eugenol (65,4%), metil Isoeugenol (6,3%), elemicine (4,7%), isoelemicine (3,4%), veratral (3,0%) y cadinol (4,1%) fueron los componentes principales (Suarez y col., 2005).

Estudios previos realizados por Carrera en 2008, dentro del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela, en los que se evaluó el efecto antiinflamatorio de otros compuestos como kaurenol, kaurenal, ácido kaurenoico, ácido grandiflorénico y 15- α -cinamoil-kaurenoico, mostraron que estos compuestos poseen actividad antiinflamatoria (Carrera, 2008).

5. Compuestos Kauranos a evaluar: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine

Los compuestos que se van a utilizar en este trabajo son Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, estos compuestos recientemente extraídos a partir de extractos de *C. micans* una planta de la familia Euphorbiaceae, del genero *Croton*. Investigadores del grupo de trabajo de la Dra. Suárez, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela están trabajando en la Etnobotánica de dicha planta. No obstante, las estructuras dilucidadas hasta el momento (**Figuras 9, 10 y 11**), muestran similitud con los compuestos diterpenoides, explicados anteriormente.

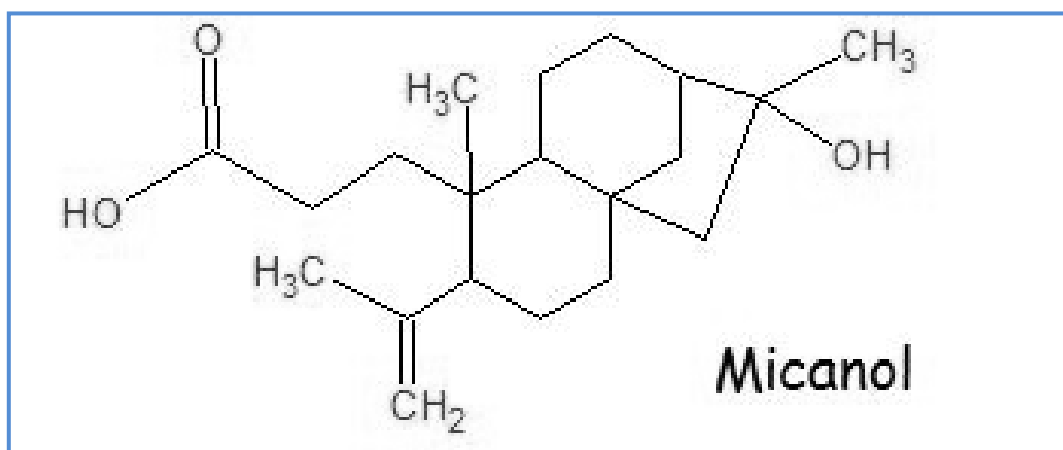


Figura 9. Micanol. Estructura química elaborada bajo el programa ACD/ChemSketch (V 12.01), según datos suministrados por Dra. A. Suarez.

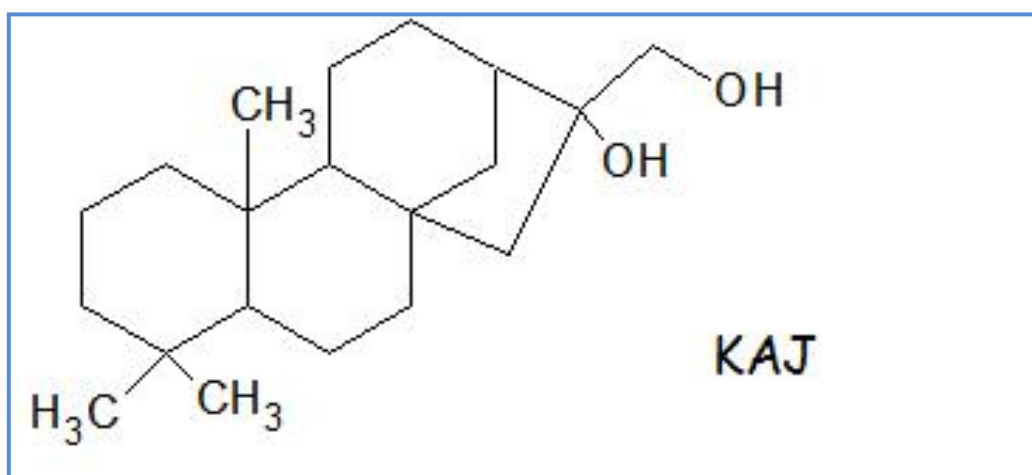


Figura 10. KAJ. Estructura química elaborada bajo el programa ACD/ChemSketch (V 12.01), según datos suministrados por Dra. A. Suarez.

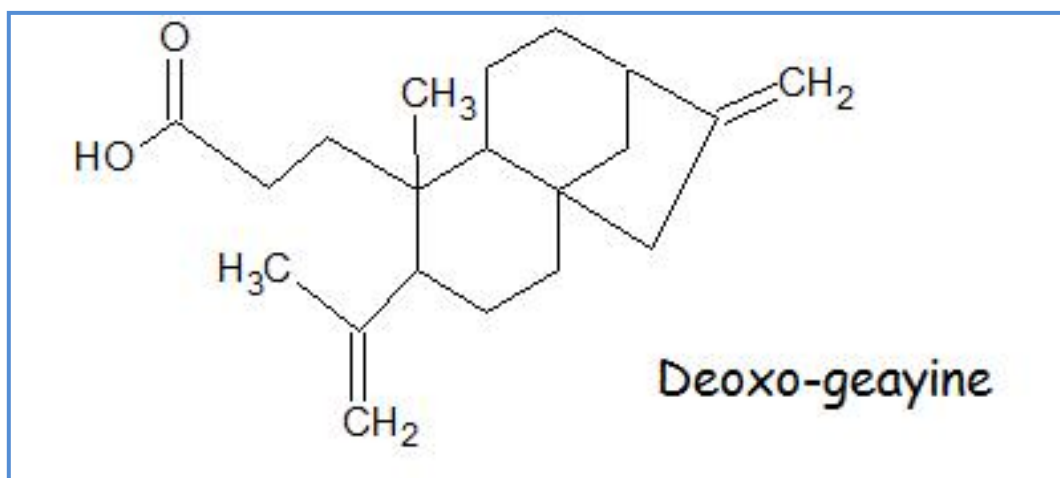


Figura 11. Deoxo – geayine. Estructura química elaborada bajo el programa ACD/ChemSketch (V 12.01), según datos suministrados por Dra. A. Suarez.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- El objetivo general es estudiar el posible efecto antiinflamatorio de los compuestos extraídos de plantas del género *Croton*: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre leucocitos humanos y múridos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Determinar el efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre las líneas celulares leucémicas Jurkat E6.1, U937; macrófagos múridos RAW 264.7 (estimulados con LPS) y leucocitos humanos (estimulados con PMA), evaluando la viabilidad, mediante el método de MTT.
- 2.- Determinar el efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con PMA.
- 3.- Determinar el efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos múridos RAW 264.7 estimulados con LPS.
- 4.- Evaluar la actividad captadora del radical óxido nítrico por los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, mediante el ensayo con Nitroprusiato de Sodio (NPS).
- 5.- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, mediante la reducción captadora del radical DPPH.

1. Preparación de reactivos

1.1. Preparación de los medios de cultivo suplementados (RPMI y Dulbecco)

Los medios de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen®) y Dulbecco (Invitrogen®), fueron preparados según las instrucciones del fabricante y esterilizados, se suplementaron con penicilina G (100 unidades/mL); sulfato de estreptomicina (100000 µg/mL), L-glutamina (0,3 mg/mL) y 10 % de suero bovino fetal previamente inactivado por calor a 56 °C.

1.2. Preparación del buffer salino fosfato suplementado (PBS gel)

El buffer salino fosfato se preparo a pH $7 \pm 0,2$ en agua destilada, para que su composición final sea la siguiente: Na_2HPO_4 (86,7 mM), NaCl (2 M) y K_2HPO_4 (13,05 mM). Una vez preparado se esterilizo por filtración y se preservó a 4 °C. La gelatina se preparo al 10 % p/v en agua destilada, y adicionalmente glucosa y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cantidad necesaria para obtener concentraciones finales de 0,5 M y 0,2 M, respectivamente.

1.3. Preparación de la solución de lisis

Esta solución fue preparada en agua destilada autoclavada, empleando NH_4Cl para una concentración final de 1,5 M, EDTA (12,66 mM) y NaHCO_3 (0,1 M). Conservándola a 4 °C, y para el momento de su utilización se diluyo al 10 % en agua destilada autoclavada.

1.4. Preparación de las soluciones de los compuestos

Los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido puro (DMSO, es un líquido orgánico usado como solvente, el cual es aprótico y altamente polar, por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas entre otros), cantidad necesaria para obtener una solución concentrada 0,1 M, a partir de la cual se prepararon las siguientes diluciones en agua destilada estéril: 1000 µM, 500 µM, 250 µM,

100 μM , 25 μM , 10 μM , y 2,5 μM , Estos compuestos se conservaron a 4 °C, y fueron empleados en los ensayos, previa agitación con vórtex.

2. Cultivos celulares

Para este estudio se emplearon leucocitos humanos obtenidos de sangre total, y varias líneas celulares. De origen murino se utilizó la línea celular RAW 264.7 (macrófagos), y de origen humano las células leucémicas U937 (linfoma monocítico), Jurkat E6.1 (células T linfoblásticas). La línea celular murina fue mantenida en medio Dulbecco suplementado y las líneas celulares humanas en medio nutritivo RPMI 1640 suplementado; todas las líneas se mantuvieron incubadas en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, oxígeno y a 37 °C.

En el caso de la línea celular adherente RAW 264.7, fueron retiradas del frasco de cultivo mediante choque térmico utilizando PBS gel frío, y luego fueron tratadas como las demás líneas celulares.

Tanto las células obtenidas de cultivo, como los leucocitos frescos, fueron contadas al microscopio por el método de exclusión con azul de tripano, empleando la cámara de Neubauer. Es importante mencionar que sólo se emplearon suspensiones celulares que tengan una viabilidad superior al 95 %, determinada por el conteo con azul de tripano.

3. Purificación de leucocitos humanos

La purificación de leucocitos humanos a partir de sangre total anticoagulada con heparina, (obtenida de donantes voluntarios del Instituto de Inmunología, a los cuales se le informó debidamente del protocolo a seguir) se llevó a cabo mediante lisis diferencial, técnica en la que se utilizan reactivos que lisan sólo determinados grupos celulares. Esta

solución de lisis constituida por NH_4Cl , NaHCO_3 y EDTA (Duque y col., 1985; Lund-Johansen y Olweus, 1992; Lehmann y col., 1997; Lara y col., 1997), con la que se producirá el shock osmótico de los eritrocitos de la sangre, a partir de la cual, en la mezcla quedan los leucocitos de interés y plaquetas, estos últimos fueron separados mediante centrifugación diferencial.

4. Conteo, observación y determinación de viabilidad de las poblaciones celulares por marcaje con azul de tripano

Este método se basa en una característica que diferencia las células viables de las no viables, ya que en las células muertas hay pérdida de la función de transporte a lo largo de la membrana plasmática así como de su integridad, lo que permite que el colorante que penetra en su interior no pueda ser excluido, tiñendo su contenido de color azul oscuro (Schmid y col., 2001). Consistirá en agregar en un contenedor apropiado 20 μL de la suspensión celular más 20 μL de colorante, mezclando con la micropipeta y colocándola en la cámara de Neubauer.

5. Determinación del efecto de compuestos kauranos sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos múridos RAW 264.7 (método de Griess).

El método de Griess (Green y col., 1982; Dirsch y col., 1998; Gannon y col., 2001), será usado para observar el efecto de los compuestos estudiados, sobre la producción de nitrito en macrófagos múridos RAW 264.7 pre-tratados con dichos compuestos y activados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS), ya que el radical óxido nítrico producido por las células estimuladas, es rápidamente metabolizado en los productos estables nitrito y nitrato

(Moshage, 1997). Para este ensayo se colocó un volumen de 180 μL de las células (5×10^4 cél/pozo) resuspendidas en medio Dulbecco suplementado, y se pre-incubaron por 1 hora con 20 μL de los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, y posteriormente estimularon con 50 μL de LPS (100 ng/mL concentración final) en placas ELISA de 96 pozos fondo plano. Luego de 72 horas de incubación a 37 °C y atmósfera con 5 % CO_2 , se extrajeron 120 μL de los sobrenadantes conteniendo el nitrito producido por las células, los cuales al reaccionar con 60 μL de sulfanilamida (2,5 % v/v en ácido fosfórico), originarán una sal diazónica de color amarillo, que formará con el segundo reactivo de Griess, la naftiletilendiamina (0,1 % v/v en solución acuosa), el producto Azo de color rosado se cuantifico a una longitud de onda de 540 nm, utilizando un lector de placas ELISA (Dirsch y col., 1998). También se determino el porcentaje de viabilidad por el método de reducción del MTT. Los valores de absorbancia de los blancos, fueron restados a los pozos remanentes, y el porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de Nítrico} = 1 - \left[\frac{\text{Nmx}}{\text{Nc}} \right] \times 100$$

Nc: Nitrito en los grupos controles tratados con LPS (Controles estimulados).

Nmx: Nitrito en los grupos tratados con los compuestos y luego estimulados con LPS.

Finalmente, el contenido de nitrito de las células tratadas será comparado con los controles estimulados y los IC_{50} serán calculados mediante regresión no lineal.

6. Ensayo de viabilidad celular: Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Este ensayo consiste en la reducción de la sal de color amarillo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en cristales de formazán de color azul, los cuales al ser disueltos en DMSO pueden ser cuantificados espectrofotométricamente, posteriormente se centrifugó a 900 g, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 20 μ L de PBS para el lavado de las células, para posteriormente se adicionaron 50 μ L de MTT (0,4 mg/mL en PBS). Después de 4 horas de incubación a 37 °C con dicho reactivo, se centrifugó y se le extrajo el sobrenadante, seguido se adicionaron 200 μ L de DMSO, y se leyó a la densidad óptica a 540 nm en un lector de ELISA (con agitaciones previas). El IC_{50} fue calculado mediante regresión no lineal (para ello se utilizó el programa Prism version 4).

7. Actividad captadora del radical óxido nítrico (NPS)

La oxidación por radicales libres y peroxidación lipídica en sistemas biológicos ha sido considerada como uno de los principales mecanismos de daño celular en organismos aeróbicos sometidos a estrés oxidativo (Olalye y Rocha, 2007). Los donadores de óxido nítrico son sustancias farmacológicamente activas que liberan NO *in vivo* o *in vitro*, y la mayoría de ellos tiene un grupo nitroso funcional en su estructura.

El nitroprusiato de sodio (NPS, $Na_2[(CN)_5FeNO]_2H_2O$) es uno de ellos, y éste al interactuar con un agente reductor o en presencia de luz libera el NO (Maccocci y col., 1994; Bonaventura y col., 2006). En solución, una vez formado el NO, y en presencia de oxígeno, éste es convertido en nitrito, que puede ser cuantificado por el ensayo de Griess

(Green y col., 1982). Pero cuando en el medio hay sustancias capaces de captar directamente el NO, éstas compiten con el oxígeno en la reacción de formación de este radical, disminuyendo así la cantidad de NO formado (Sreejayan y Rao, 1997). A fin de conocer si los compuestos estudiados poseen actividad captadora de óxido nítrico, se utilizó un ensayo libre de células, en el cual se incubaron los compuestos en placas ELISA de 96 pozos fondo plano. Para ello se colocó 20 μL de los compuestos kauranos con 180 μL de NPS (2,5 mM concentración final) disuelto en RPMI, durante dos horas en presencia de luz incandescente continua y con agitación, y luego se procedió a determinar la cantidad de nitrito presente en los sobrenadantes, por el método de Griess descrito previamente.

8. Método de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT)

La reducción del azul de tetrazolio (NBT) puede ser utilizada para medir las capacidades redox de células fagocíticas estimuladas (Baehner y col., 1976; Esfandiari y col., 2003), ya que en esta reacción, la formación de un anillo insoluble de formazán azul, refleja la acción de una oxidasa de la Nicotinamida - Adenina Dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) o NADH dependiente de oxígeno (Choi y col., 2006) en células metabolitamente activas. El método del NBT se utilizó para cuantificar la variación en la producción de anión superóxido, consecuencia de la posible inhibición producida por los compuestos estudiados, sobre la cascada de reacciones pro-inflamatorias inducida por el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo al protocolo planteado por Rook y col. (1985), con las modificaciones descritas por Rainard en 1986, para placas de ELISA.

En este ensayo se incubó durante 45 min. un volumen de 180 μL de suspensión celular (3×10^5 cél/pozo en PBS gel) con 20 μL de las concentraciones crecientes de los

compuestos kauranos en placas ELISA fondo plano, y posteriormente se adicionó 50 µL de la mezcla NBT (0,75 mg/ml)/PMA (100 ng/mL) en PBS, luego se incubó a 37 °C durante 2 horas adicionales. Transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados de los pozos empleando 200 µL de PBS, y un último lavado con la misma cantidad de metanol puro, para, una vez retirado todo el metanol, dejarlos secar al aire, y adicionar 90 µL de hidróxido de potasio (KOH) (2 M) y 160 µL de DMSO puro. La agitación de estas placas fue durante 30 minutos (en algunos casos, durante toda la noche) lo cual permitió disolver los cristales formados en el fondo de los pozos, y el posterior registro de su D.O. a 620 nm en el lector de placas ELISA. Luego se calculo el IC₅₀ para los compuestos (programa estadístico Prism version 4). Los valores de absorbancia de los blancos, fueron restados al resto de los pozos, y el porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Reducción del NBT} = \left[\frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}} \right] \times 100$$

Abs. Muestra: Absorbancia de los leucocitos tratados con los compuestos y estimulados con PMA.

Abs. Control: Absorbancia de las células estimuladas con PMA, no tratadas con los compuestos.

9. Ensayo de la capacidad oxidativa: Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelular por citometría de flujo

En este ensayo, descrito por Bass y col. en 1983, se utilizo el diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA), que es permeable a la membrana de las células, este compuesto entra al interior celular donde ocurre el clivaje de sus grupos acetato por esterasas inespecíficas presentes en el medio intracelular, produciendo un compuesto impermeable no fluorescente, que es la diclorodihidrofluoresceína (DCFH, por sus siglas en inglés). Una vez que las células son estimuladas con PMA, el peróxido de hidrógeno

producido (H_2O_2), a causa de la estimulación, es capaz de oxidar el compuesto a un producto fluorescente la diclorofluoresceína (DCF, por sus siglas en inglés), cuya concentración intracelular puede ser determinada por citometría de flujo. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 488 nm y 525 nm, respectivamente.

El ensayo se llevo a cabo en oscuridad y consistió en incubar en tubos de citometría: 50 μ L de las concentraciones crecientes de cada compuesto kaurano (Micanol, KAJ y Deoxo-geayine) y 450 μ L de suspensión de leucocitos frescos (5×10^5 cél/tubo) durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 20 μ L de DCFH-DA (0,25 mM disuelto en etanol absoluto, y diluido en PBS) posteriormente se incubaron en baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Luego se adicionaron a los tubos, 20 μ L de PMA (100 ng/mL concentración final) en PBS, luego, y se procedió a incubar durante 15 min. en baño de agua a 37 °C, al cabo de los cuales se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo hasta la lectura en el citómetro.

10. Determinación del potencial de captación de radicales libres mediante el uso de DPPH

Este ensayo descrito por primera vez en 1958 por Blois, se basa en las propiedades cromáticas del compuesto 1,1-difenil-2-picrylidrazil (DPPH), un radical catiónico estable, debido al electrón que se encuentra deslocalizado sobre la molécula en su totalidad, de modo que no permite que la molécula dimerice, como en el caso de la mayoría de los radicales libres (Molyneux, 2004; Washida, 2007). Esta deslocalización también da origen a un color violeta oscuro, que en una solución de etanol tiene una longitud de onda de máxima absorción a 517 nm.

Entonces, cuando una solución de DPPH es mezclada con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, esto origina la forma reducida (no radical) del compuesto con la pérdida del color violeta. Brevemente, se colocaron 20 μL de los compuestos estudiados en placas ELISA fondo plano, y se les adicionaron 50 μL de buffer Tris-HCl (100 nM; pH 7,6) y 130 μL de DPPH (75 μM concentración final) en etanol, y luego de agitar durante 30 minutos, se procedió a leer la absorbancia a 540 nm. Todo en oscuridad. El ácido ascórbico y la quercetina en una concentración de 10 mM fueron usados como controles positivos ya que son anti-oxidantes comercialmente conocidos.

11. Ensayo de proliferación por citometría de flujo

Con la finalidad de determinar el efecto de los compuestos estudiados sobre la proliferación celular, se aplicó una técnica de citometría de flujo basada en la división serial y equitativa de un marcaje fluorescente. Este método emplea el cromóforo carboxifluoresceína succinimidil ester diacetato (CFSE-DA), descrito en 1994 por Lyons y Parish, el cual es repartido con remarcable fidelidad entre las células hijas luego de ocho a diez generaciones discretas pudiendo ser identificadas (Hasbold y col., 1999; Lyons, 1999; Fazekas y col., 1999; Lyons, 2000). El CFSE-DA es permeable a la membrana gracias a sus dos cadenas de acetato, las cuales una vez que el colorante ha penetrado al interior celular, son removidas por esterasas intracelulares. Pero la carboxifluoresceína succinimidil éster resultante, tiene una tasa de salida de la célula muy baja, por lo que puede unirse covalentemente a proteínas intracelulares del citoesqueleto mediante su molécula succinimidil, la cual reacciona con grupos amino, formando un enlace amida altamente estable (Parish, 1999). Este ensayo se llevo a cabo utilizando las líneas celulares Jurkat E6.1 y U937 (5 x 10⁵ cél/pozo), las cuales se incubaron en placas ELISA de 96 pozos

fondo en U, con 20 μL de los compuestos kauranos y 180 μL del CFSE-DA (2,5 μM concentración final y diluido en RPMI), durante 72 horas a 37 °C y atmósfera con 5 % de CO_2 en medio RPMI suplementado. Transcurrido el tiempo de incubación, y al menos 10 minutos antes de realizar el análisis por citometría de flujo, se extrajo todo el contenido de los pozos, y se colocó en tubos de citometría y se les adicionó 100 μL de yoduro de propidio, con el fin de evaluar la viabilidad de las células.

Para el análisis de la proliferación por citometría de flujo se estudiaron los histogramas obtenidos por el equipo. En la figura 12 (izquierda) se aprecia un gráfico de dispersión lateral (SS, por sus siglas en inglés Side Scatter) contra dispersión frontal (FS, por sus siglas en inglés Front Scatter), donde la región A representa la población de células de estudio; de esta región se hace un estudio de la variación de la intensidad de fluorescencia, el cual se observa en la figura 12 (derecha). En esta figura se toman el valor de intensidad media de fluorescencia de la región D, en esta imagen se observan dos curvas, una punteada representando el valor de intensidad media de fluorescencia del control (células no tratadas con los compuestos kauranos) y otra curva de línea continua que representa el valor de intensidad de fluorescencia de células tratadas con una concentración en particular de un compuesto kaurano (en este ejemplo, compuesto Micanol 10 μM).

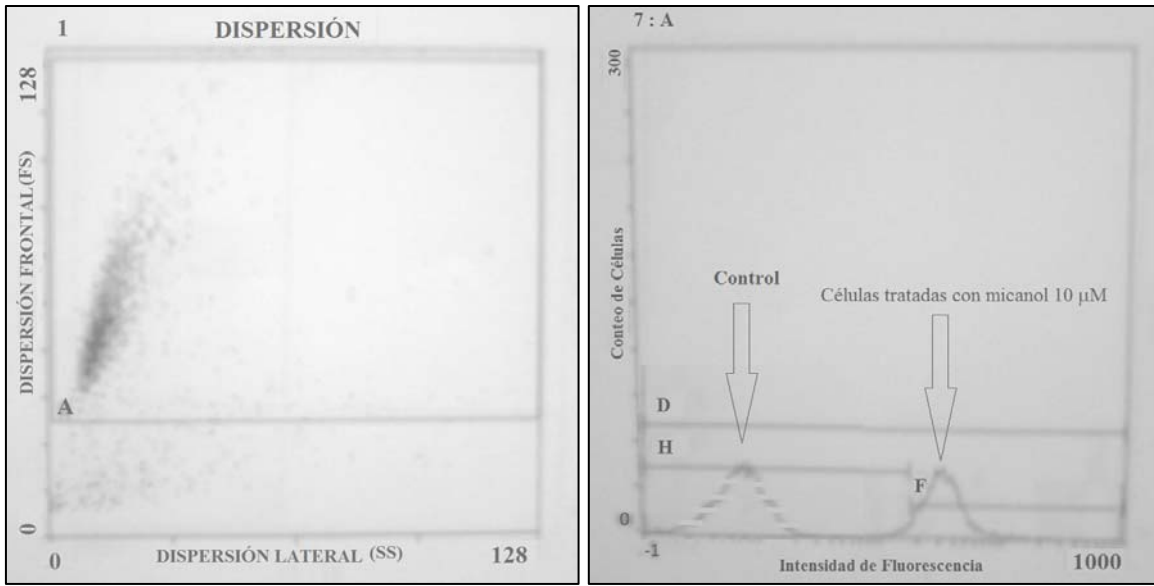


Figura 12. Se representa el citograma de la línea celular a estudiar a la izquierda y el histograma de proliferación obtenidos por citometría de flujo. En la figura **a**, se observa la ventana A, la cual representa la población total de células. Por otro lado la figura **b**, muestra el histograma 7:A, donde se visualizan los datos de interés, tomando como valores relevantes la región D, la cual nos provee información acerca de la intensidad media de fluorescencia la cual se toma para el cálculo del porcentaje de proliferación, respecto al control (células no tratadas con kauranos). Nótese el desplazamiento hacia la derecha del valor de intensidad para un compuesto, en relación al valor de referencia control.

12. Estadística

Todos los experimentos fueron llevados a cabo al menos por triplicado. Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar (S.D.). La significancia estadística de los datos fue analizada usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la prueba de comparaciones múltiples Bonferroni, donde $p < 0,05$ ó $p < 0,01$ serán consideradas estadísticamente significativas. Los valores medios geométricos IC_{50} , acompañados por su respectivo límite de confianza 95%, fueron determinados por una regresión no lineal de los experimentos individuales usando el programa estadístico Graph Pad Prism, versión 4.

RESULTADOS

1. - El efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre las líneas celulares Jurkat E6.1 y U937, ensayo de viabilidad celular: Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en células leucémicas humanas:

1.1.- Línea Jurkat E6.1

A continuación, se muestran los resultados del análisis espectrofotométrico en placas de ELISA, donde se estudió el efecto de los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine sobre la viabilidad de células Jurkat E6.1. Las células fueron incubadas en las condiciones anteriormente expuestas, durante 24 horas con un mínimo de 5 concentraciones por compuesto.

Tabla 1. El efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la línea celular leucémica Jurkat E 6.1, ensayo de viabilidad celular en 24 horas de incubación: Reducción del MTT.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular (respecto al control)			
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>	<i>Quercetina</i>
0,25	97,5 \pm 2,8	99,6 \pm 1,2	105,5 \pm 5,1	-
1	99,3 \pm 3,9	101,2 \pm 1,1	100,8 \pm 4,1	-
2,5	95,4 \pm 5,6	88,1 \pm 5,5	99,2 \pm 4,1	103,4 \pm 2,6
10	60,8 \pm 8,3	90,5 \pm 7,2	93,6 \pm 5,5	106,9 \pm 2,1
25	47,4 \pm 2,5	85,5 \pm 3,3	89,2 \pm 9,2	78,6 \pm 5,5
50	30,2 \pm 3,9	83,6 \pm 8,5	83,4 \pm 5,4	60,5 \pm 4,5
100	11,8 \pm 2,4	78,5 \pm 6,2	81,2 \pm 7,1	55,6 \pm 2,8

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n = 4$. Estos resultados se obtuvieron del análisis estadístico de los porcentajes relativos al control, calculado con el uso del programa estadístico Graph Pad Prism, versión 4.

Se puede observar en la tabla el efecto que muestran los compuestos sobre la viabilidad de las células Jurkat E 6.1. Los cultivos fueron expuestos a concentraciones crecientes de los compuestos kauranos e incubadas durante 24 horas, para luego medir espectrofotométricamente la cantidad de MTT reducido por las células metabólicamente activas (n = 4). En la tabla 1, se observa que el compuesto Micanol a la mayor concentración evaluada (100 μM) tiene un efecto inhibitorio importante (de aproximadamente 90%) sobre la viabilidad de estas células, en comparación con los demás compuestos.

Tabla 2. Valores del IC₅₀ en el porcentaje de viabilidad sobre células Jurkat E 6.1, a través del método reducción del MTT (24 horas).

Compuesto	IC ₅₀
Micanol	28 μM
KAJ	> 100 μM
Deoxo-geayine	> 100 μM
Quercetina	103 μM

En la **tabla 2** se expresan los valores de IC₅₀ calculados con el uso del programa estadístico Graph Pad Prism, versión 4, cada valor representa la mitad de la concentración máxima inhibitoria (del 50 %) del compuesto. De acuerdo a esto, puede notarse que el compuesto Micanol ejerce su efecto inhibitorio máximo de la viabilidad celular sobre Jurkat E 6.1, a una concentración mucho menor, en comparación a los demás compuestos, los cuales ejercen dicho efecto por encima de la concentración máxima evaluada (100 μM).

Tabla 3. El efecto de los compuestos kauranos, sobre la línea celular leucémica Jurkat

E 6.1, ensayo de viabilidad celular 48 horas: Reducción del MTT.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular			
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>	<i>Quercetina</i>
0,25	103,45 \pm 0,77	104,6 \pm 4,29	100,05 \pm 3,08	-----*
1	101,35 \pm 2,79	98,39 \pm 2,10	97,28 \pm 3,68	-----*
2,5	94,98 \pm 6,26	82,88 \pm 7,72	96,68 \pm 2,46	111,63 \pm 0,37
10	62,98 \pm 4,13	86,49 \pm 1,17	95,6 \pm 3,42	112,96 \pm 1,90
25	63,14 \pm 3,41	90,34 \pm 2,20	88,21 \pm 6,79	69,4 \pm 3,52
50	35,44 \pm 2,85	79,56 \pm 1,81	78,4 \pm 4,40	68,84 \pm 1,36
100	21,18 \pm 2,14	51,28 \pm 2,26	77,09 \pm 4,87	61,53 \pm 3,66

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n = 4$. Estos resultados se obtuvieron del análisis estadístico de los porcentajes relativos al control, calculado con el uso del programa estadístico Graph Pad Prism, versión 4. * Datos no obtenidos.

Tabla 4. Valores del IC₅₀ en el porcentaje de viabilidad sobre células Jurkat E 6.1, a través del método reducción del MTT (48 horas).

Compuesto	IC50
Micanol	37,8 μM
KAJ	106,2 μM
Deoxo-geayine	> 100 μM
Quercetina	> 100 μM

En la **tabla 4** se observan los valores de IC₅₀ del efecto de los compuestos kauranos sobre la viabilidad de células Jurkat E 6.1, es interesante observar que el efecto del Micanol

varió con respecto a su comportamiento en el tiempo de incubación 24 horas, ya que el valor de IC50 a las 48 horas de incubación aumento lo cual, hace sugerir que efecto sobre la viabilidad se ve afectado dependiente del tiempo.

Tabla 5. El efecto de los compuestos kauranos, sobre la línea celular leucémica Jurkat E 6.1, ensayo de viabilidad celular 72 horas: Reducción del MTT.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular		
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>
0,25	108,9 ± 10,3	109 ± 12,3	104,0 ± 5,5
1	119,2 ± 9,2	118,5 ± 10,2	108,5 ± 10,2
2,5	124,7 ± 10,2	139,5 ± 10,7	112,3 ± 10,9
10	132,8 ± 10,1	140,2 ± 9,1	109,1 ± 10,2
25	135,4 ± 4,1	150,4 ± 11,1	99,9 ± 10,2
50	130,3 ± 8,5	110,6 ± 9,9	103,9 ± 12,5
100	118 ± 12,4	103,5 ± 8,8	98,8 ± 7,5

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios ± SD para un n = 4. Estos resultados se obtuvieron del análisis estadístico de los porcentajes relativos al control, calculado con el uso del programa estadístico Graph Pad Prism, versión 4. * Datos no obtenidos.

Tabla 6. Valores del IC₅₀ en el porcentaje de viabilidad sobre células Jurkat E 6.1, a través del método reducción del MTT (72 horas).

Compuesto	IC50
Micanol	> 100 μM
KAJ	> 100 μM
Deoxo-geayine	> 100 μM

En esta tabla se puede observar que los valores de IC₅₀ para de los compuestos kauranos están por encima de 100 μM, lo cual nos sugiere que el tiempo de incubación es un factor determinante en el efecto sobre la viabilidad de las células.

1.2.- Línea Celular U937

Se muestra a continuación los resultados obtenidos para la evaluación de los compuestos kauranos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la línea celular leucémica U937. Estos resultados se obtuvieron bajo las mismas condiciones que para la línea celular antes expuesta.

Tabla 7. El efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la línea celular U937, ensayo de viabilidad celular en 24 horas: Reducción del MTT.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular (respecto al control)			
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>	<i>Quercetina</i>
0,25	116,6 ± 8,8	104,9 ± 9,3	112,0 ± 7,8	----- *
1	122,5 ± 10,5	88,6 ± 6,2	103,5 ± 6,2	----- *
2,5	130,5 ± 15,2	90,0 ± 6,7	99,3 ± 1,6	61,03 ± 0,37
10	118,2 ± 6,1	92,2 ± 11,4	95,1 ± 4,1	43,56 ± 0,12
25	105,4 ± 7,1	90,6 ± 7,7	93,6 ± 15,2	52,32 ± 0,11
50	98,2 ± 6,3	88,3 ± 6,1	89,9 ± 6,2	33,83 ± 0,14
100	96,2 ± 4,5	48,5 ± 5,8	77,1 ± 10,5	30,40 ± 0,08

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios ± SD para un n = 4. * Valores no obtenidos.

Estos resultados fueron obtenidos en la realización del ensayo de MTT en células U937, incubadas en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 37 °C, durante 24 horas con los compuestos kauranos (Micanol, KAJ y Deoxo-geayine). Los controles fueron incubados utilizando agua como vehículo. Como se puede apreciar según la **tabla 7** la viabilidad de las células U937 se ve afectadas por los compuestos kauranos, observándose la disminución de los valores de porcentaje de viabilidad con respecto al control a medida que se incrementa la concentración de los compuestos, es decir, a mayor concentración final del compuesto, mayor es la disminución de los valores promediados.

Tabla 8. Valores del IC₅₀ en el porcentaje de viabilidad sobre células U937, a través del método reducción del MTT en 24 horas.

Compuesto	IC ₅₀
Micanol	> 100 µM
KAJ	96,8 µM
Deoxo-geayine	> 100 µM
Quercetina	26 µM

En la **tabla 8** se muestran los resultados de IC₅₀ obtenidos a través del análisis estadístico con el uso del programa Graph Pad Prism, versión 4, cada valor representa la mitad de la concentración máxima inhibitoria (del 50 %) del compuesto. Los valores obtenidos de IC₅₀ para los compuestos Micanol y Deoxo-geayine se encuentran por encima de 100µM, por su parte el compuesto KAJ muestra un comportamiento similar al

presentado con las células Jurkat E 6.1 reportando un valor cercano a 100 μ M. Por último la quercetina mostro un efecto más severo sobre la viabilidad de esta línea celular, respecto a los otros compuestos (y en comparación a su efecto sobre Jurkat E 6.1) reportando un valor de IC₅₀ bajo, 26 μ M.

2. El efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, en macrófagos múridos RAW 264.7, ensayo de viabilidad celular: Reducción del MTT.

Este experimento se realizó paralelamente al ensayo de la determinación del efecto de los compuestos kauranos sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos múridos RAW 264.7 (método de Griess) como medida de la viabilidad de las células al momento de efectuar dicho experimento y, adicionalmente, como medida de confiabilidad de los resultados obtenidos.

Al finalizar este ensayo, se realizó una incubación adicional de 4 horas con el MTT, lo que permitió verificar el estado de las células. En todos los casos, el control de la prueba fue observar el crecimiento de las células libres del efecto de algún compuesto, por ello, se reemplazó el volumen del compuesto por igual volumen de agua y se incubaron bajo las mismas condiciones que las células tratadas con los compuestos. Sin embargo, no a todos los controles se les agregó el estímulo LPS. De allí, que sólo los controles estimulados sirvieron de base para los cálculos posteriores.

Tabla 9. El efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, en macrófagos múridos RAW 264.7, ensayo de viabilidad celular en 24 horas: Reducción del MTT.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular (respecto al control)		
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>
0,25	95,1 \pm 6,8	109,6 \pm 10,8	109,5 \pm 15,1
1	91,1 \pm 10,6	112,5 \pm 4,2	101,8 \pm 12,5
2,5	88,1 \pm 6,2	99,8 \pm 3,3	105,3 \pm 4,4
10	84,6 \pm 5,1	106,7 \pm 1,9	118,1 \pm 6,5
25	75,6 \pm 6,5	105,9 \pm 2,6	111,2 \pm 6,9
50	59,9 \pm 7,1	99,9 \pm 7,4	114,6 \pm 12,9
100	39,5 \pm 8,1	95,6 \pm 3,1	92,3 \pm 8,8

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n \geq 4$.

En la tabla 9 se muestra los resultados obtenidos en este ensayo, los compuestos KAJ y deoxo-geayine, no parecen tener efectos sobre la viabilidad de los macrófagos múridos RAW 264.7, mostrando una variación de sus valores poco significativa respecto al control. Por otro lado, el compuesto Micanol muestra una disminución creciente de los valores de porcentaje de viabilidad a medida que se incrementa su concentración, sin embargo se presenta una disminución significativa de sus valores en la concentración más alta del compuesto (100 μM) donde se compromete la viabilidad de estas células en aproximadamente un 40%.

Tabla 10. Valores del IC₅₀ en el porcentaje de viabilidad sobre macrófagos múridos RAW 264.7, ensayo de viabilidad celular: Reducción del MTT.

Compuesto	IC ₅₀
Micanol	82,3 μM
KAJ	> 100 μM
Deoxo-geayine	> 100 μM

En esta se muestran los resultados de IC₅₀ obtenidos a través del análisis estadístico con el uso del programa Graph Pad Prism, versión 4, cada valor representa la mitad de la concentración máxima inhibitoria (del 50 %) del compuesto sobre macrófagos múridos RAW 264.7. En esta tabla puede distinguirse que el IC₅₀ del compuesto Micanol está por debajo de los valores de IC₅₀ de los demás compuestos.

3. Ensayo de viabilidad celular: Reducción del MTT, en leucocitos totales.

Este ensayo se realizó paralelamente al de la determinación del efecto de los compuestos kauranos sobre la inhibición de la producción de anión superóxido intracelular en leucocitos totales (método de reducción del NBT), como medida de la viabilidad de las células al momento de efectuar dicho experimento y, adicionalmente, como medida de confiabilidad de los resultados obtenidos. En este ensayo las células fueron incubadas durante las 2 horas del ensayo de reducción del NBT en las condiciones anteriormente descritas, siendo estimuladas con PMA (100 ng/mL). Luego se procedió a realizar la

incubación de 4 horas con el reactivo MTT, de igual forma se tomo como controles las células no tratadas con ningún compuesto, reemplazando el volumen del compuesto por agua. No obstante, no a todos los controles se les agrego el estimulo LPS, de este modo, solo los controles estimulados sirvieron de base para los cálculos.

Tabla 11. Medida de la viabilidad de los leucocitos humanos totales, tratados con concentraciones crecientes de los compuestos kauranos y estimuladas con PMA.

Concentración (μM)	% de Viabilidad celular (respecto al control)		
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>
0,25	146,30 \pm 6,55	161,57 \pm 3,27	188,58 \pm 8,75
1	142,13 \pm 1,96	182,10 \pm 4,57	186,73 \pm 8,35
2,5	192,36 \pm 8,70	157,41 \pm 9,17	179,17 \pm 1,96
10	163,58 \pm 1,07	181,79 \pm 5,10	162,96 \pm 1,31
25	173,61 \pm 7,71	182,87 \pm 3,27	158,02 \pm 8,60
50	-----*	183,56 \pm 6,52	135,49 \pm 5,88

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un n = 4. * Valor no obtenido.

La **tabla 11** muestra los resultados obtenidos en este ensayo con respecto a los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, luego de una incubación de 2 horas (debido a con un tiempo mayor, estas células mueren), se midió espectrofotométricamente la cantidad

de MTT reducido por las células activas. Se observa muy poca variación de los valores de porcentaje de viabilidad mientras se aumentan las concentraciones de dichos compuestos.

4. Determinación del efecto de compuestos kauranos sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés Nitric Oxide) en macrófagos murinos RAW 264.7 (método de Griess).

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el ensayo sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico, estos datos se obtuvieron del análisis espectrofotométrico en placas de ELISA, estudiándose el efecto de los compuestos Micanol, KAJ y deoxo-guayina, en macrófagos murinos RAW 264.7, estimulados con LPS (figura 12). Las células fueron incubadas durante 72 horas, siendo previamente estimuladas con LPS (100 ng/mL). Al finalizar este tiempo, se retiró de las placas un volumen de medio (que contiene los nitritos producidos durante el tiempo de incubación) posteriormente se adicionaron los reactivos del método de Griess para cuantificar el producto Azo resultante, el cual es una medida indirecta de la cantidad de NO producido por los macrófagos. El control de la prueba fue el mismo usado para el análisis de la viabilidad celular, es decir, los pozos donde las células fueron incubadas con agua y estimuladas con LPS (Control estimulado) y que posteriormente se le continuó con el mismo protocolo.

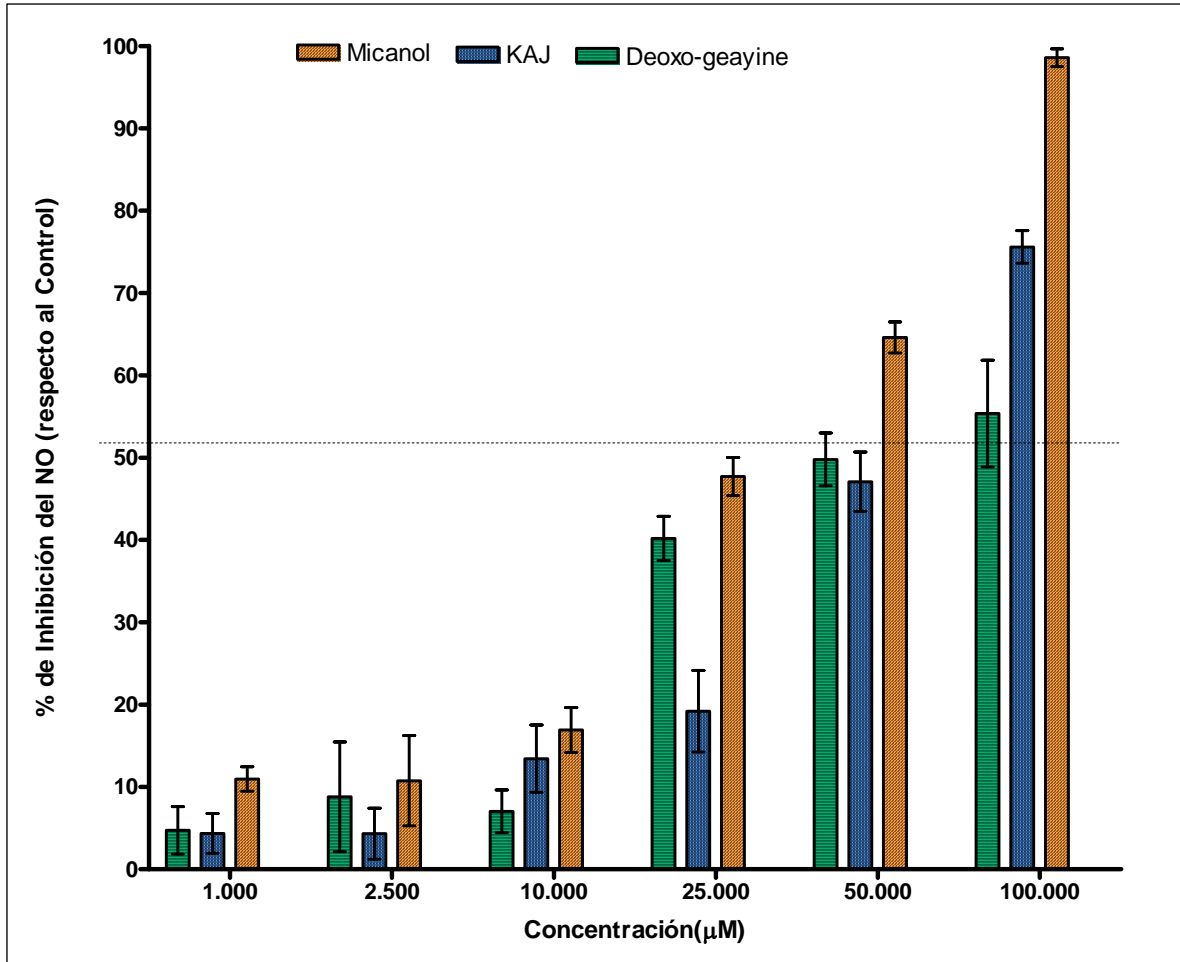


Figura 13. Medida de la inhibición de la producción de óxido nítrico intracelular usando el método de Griess, en células RAW 264.7. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos kauranos y estimuladas con LPS. Luego de una incubación de 72 h, se midió espectrofotométricamente la cantidad de nitrito formado. Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n \geq 4$.

Tabla 12. Valores del IC₅₀ en la inhibición de la producción de óxido nítrico intracelular usando el método de Griess, en células RAW 264.7. Cada valor representa la mitad la concentración máxima inhibitoria del compuesto.

Compuesto	IC50
Micanol	35 μ M
KAJ	> 50 μ M
Deoxo-geayine	> 50 μ M

Como se puede apreciar el compuesto Micanol es el que tiene un valor de IC₅₀ más bajo en este ensayo, por lo que su efecto inhibitorio en la producción de óxido nítrico se alcanza a una concentración menor.

5. Actividad captadora de radical óxido nítrico (NPS)

El ensayo realizado con el nitroprusiato de sodio (NPS) permitió conocer la confiabilidad de los compuestos estudiados en relación a la interferencia o no interferencia de estos en los ensayos donde se produzcan especies reactivas de nitrógeno. Este ensayo fue realizado sin células, lo cual permitió cuantificar la cantidad de NO formado por la reacción del NPS con el oxígeno. Luego, a través del método de Griess se midió la capacidad de los compuestos kauranos de competir con el oxígeno y disminuir así, la cantidad de NO formado.

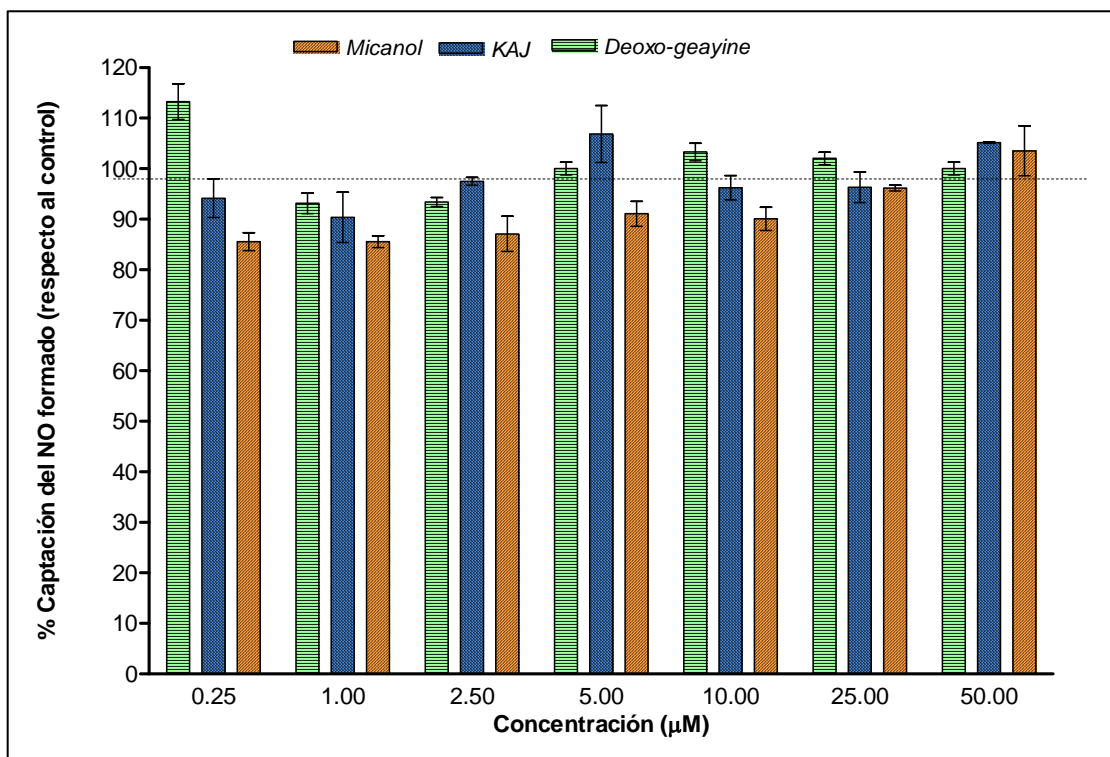


Figura 14. Medida de la actividad captadora de óxido nítrico mediante el uso del nitroprusiato de sodio (NPS). Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n \geq 4$. Los compuestos kauranos se incubaron durante 1 h con el NPS (donador de NO) en un ensayo libre de células y se midió la cantidad de NO formado a través del método de Griess.

6. Método de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT)

A continuación, se muestran los resultados del análisis espectrofotométrico de placas de ELISA, donde se estudió el efecto de los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, sobre la inhibición de la producción de anión superóxido en leucocitos humanos totales estimulados con PMA. Las células fueron incubadas con los compuestos durante 1 hora. Al finalizar este tiempo, se estimularon con PMA (100 ng/mL) y se adicionó el NBT para

cuantificar del producto azo resultante, el cual es la medida indirecta de la cantidad de O_2^- producido por los leucocitos. El control de la prueba fue el mismo control tomado para el análisis de la viabilidad celular, es decir, los pozos donde las células fueron incubadas con agua y estimuladas con PMA (Control estimulado).

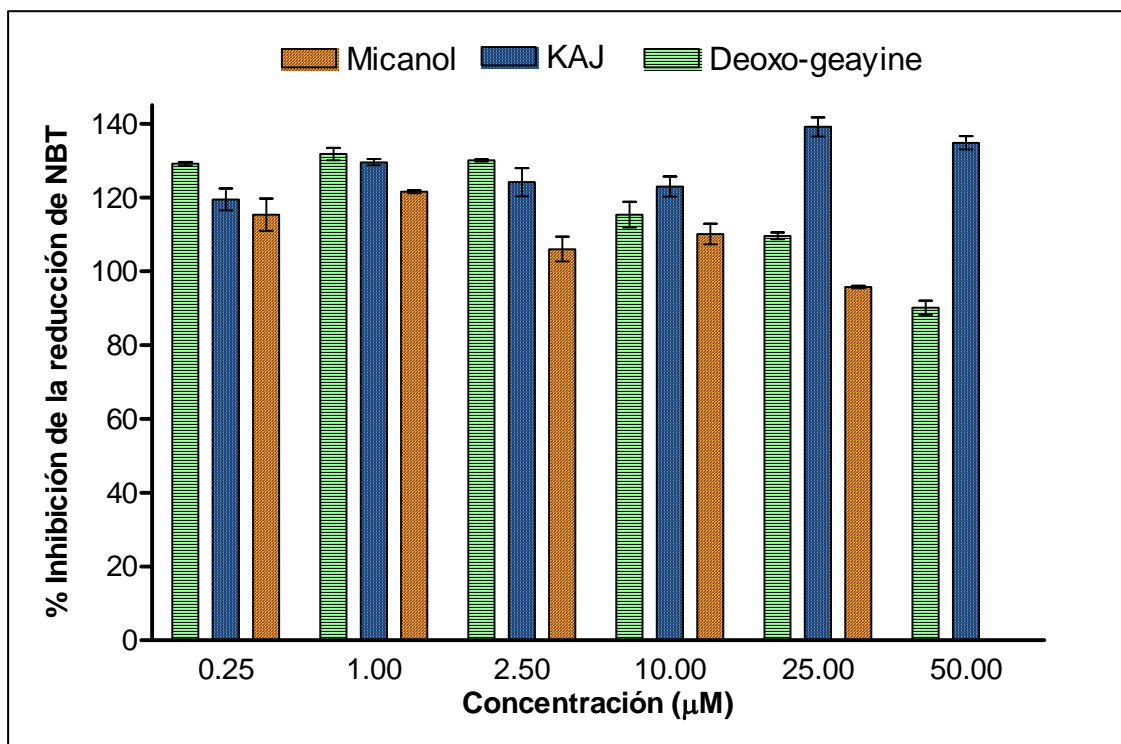


Figura 15. Medida de la inhibición de la producción de anión superóxido intracelular usando el método de reducción del NBT, en leucocitos humanos totales. Las células fueron incubadas por 2 h con los compuestos kauranos y estimuladas con PMA, para luego medir espectrofotométricamente la cantidad de NBT reducido ($n = 4$). Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n = 4$.

La figura 15, corresponde a la evaluación de los compuestos kauranos y sus efectos sobre la producción de O_2^- por leucocitos humanos totales, se observa poca variación en los

valores de porcentaje de inhibición respecto con el compuesto KAJ. La acción de los compuestos Deoxo-geayine y Micanol se evidencia como una disminución progresiva en los valores de la inhibición de la producción de anión superóxido intracelular, a medida que se aumentan las concentraciones finales de dichos compuestos.

Tabla 13. Valores del IC₅₀ en la inhibición de la producción de anión superóxido intracelular usando el método de reducción del NBT, en leucocitos humanos totales.

Cada valor representa la mitad la concentración máxima inhibitoria (del 50 %) del compuesto.

Compuesto	IC ₅₀
Micanol	> 100 µM
KAJ	> 100 µM
Deoxo-geayine	> 100 µM

Como se muestra en esta **tabla 13** los valores de IC₅₀ de los compuestos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine se encuentran por encima de 100 µM, lo cual nos indica que dichos compuestos no ejercen efectos sobre la inhibición de la producción del anión superóxido intracelular.

7. Ensayo de la capacidad oxidativa: Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelular por citometría de flujo.

Los resultados arrojados por este ensayo fueron graficados en forma de histogramas. Donde se muestran tres poblaciones celulares: la población A representa a los linfocitos, la

población B a los monocitos, y la población C a los polimorfonucleares (PMNs) (Resultados no mostrados). La población con mayor granularidad y tamaño es la de polimorfonucleares, seguida por los monocitos y por último la población linfocitaria, debido a esto, los polimorfonucleares poseen una mayor capacidad de producción de peróxido de hidrógeno. De allí, que se presentan los próximos resultados haciendo énfasis en la población de polimorfonucleares, la cual es representativa de lo observado en las otras dos poblaciones. En la tabla 14, se resumen los resultados de porcentaje de inhibición de la producción de H_2O_2 , para la población de PMN tratada a las diferentes concentraciones de cada compuesto kaurano.

A continuación se muestran algunos histogramas de los resultados de la capacidad oxidativa de los compuestos kauranos y de la quercetina. La **figura 16** muestra un gráfico de dispersión lateral “SS” (medida de la complejidad de las células) contra la dispersión frontal “FS” (medida del tamaño de las células) obtenido del citómetro de flujo. En dicho gráfico se observan tres regiones (A, B y C), la región A hace referencia a los linfocitos, la región B agrupa a los monocitos y por último la región C contiene a los polimorfonucleares (PMN). La **figura 16** es un esquema general de la selección de los linfocitos para todos los ensayos.

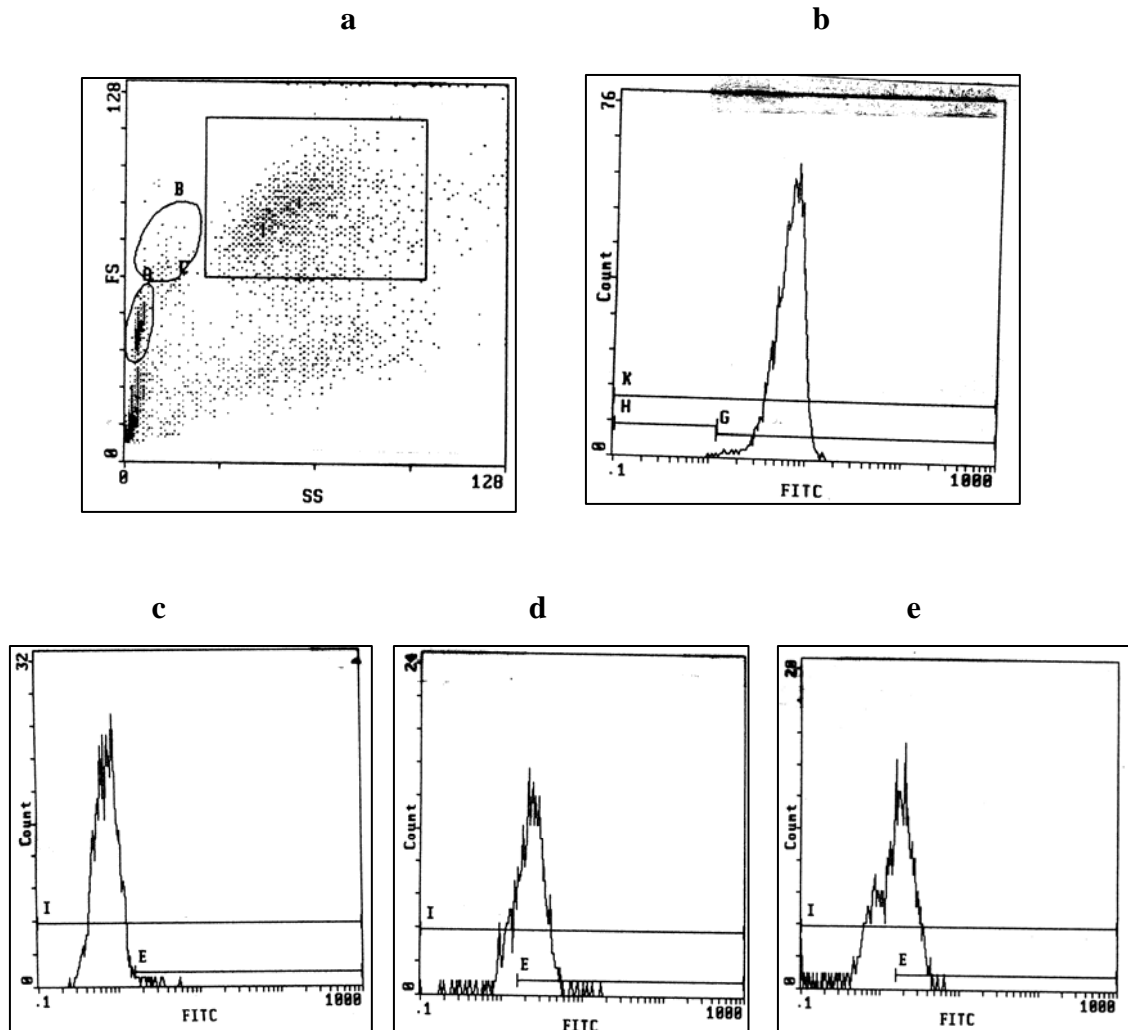


Figura 16. En el grafico a se representa la selección de linfocitos de población total de leucocitos humanos por citometría de flujo. Se observa un citograma de dispersión lateral (SS) contra dispersión frontal (FS) de leucocitos humanos totales, extraídos de sangre periférica. En la región A los linfocitos, región B los monocitos y la región C los polimorfonucleares (PMN). En los histogramas c, d y e se observan las intensidades de fluorescencia contra conteo de células para los compuestos Mcanol, KAJ y Deoxo-gayine, respectivamente. Nótese la región I representa el valor de intensidad de fluorescencia para el control (células no tratadas con ningún compuesto y estimuladas con PMA), se considera que el valor de intensidad media de fluorescencia es el 100%, referencia para realizar los cálculos de los resultados con los compuestos.

Tabla 14. Determinación de la producción intracelular de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo en leucocitos humanos tratados con Micanol, KAJ, Deoxo-geayine, y luego estimulados con PMA.

Concentración (μM)	% con respecto al control de la producción de H_2O_2			
	<i>Micanol</i>	<i>KAJ</i>	<i>Deoxo - geayine</i>	<i>Quercetina</i>
2,5	82,43 \pm 0,71	82,10 \pm 0,85	78,89 \pm 0,78	51,18 \pm 1,63
5	78,21 \pm 0,21	76,02 \pm 1,84	74,33 \pm 1,56	15,54 \pm 0,30
10	72,97 \pm 0,28	81,59 \pm 0,49	63,18 \pm 0,14	11,30 \pm 0,28
25	60,81 \pm 0,28	65,04 \pm 2,76	34,63 \pm 1,34	6,42 \pm 0,31
50	21,02 \pm 0,14	43,75 \pm 1,06	18,28 \pm 0,27	3,21 \pm 0,40

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control con PMA (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n = 4$.

Los valores mostrados en la tabla 14, son el Promedio \pm S.D., para un $n = 4$, de la relación entre las intensidades medias de fluorescencia de las células tratadas y el control estimulado, expresados en términos porcentuales. En éste experimento se usaron como control, los leucocitos estimulados con PMA (control estimulado) que fueron incubados con agua, y no fueron tratados con ninguno de los compuestos kauranos.

Tabla 15. Valores del IC₅₀ en la inhibición de la producción intracelular de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo en leucocitos humanos totales, estimulados con PMA. Cada valor representa la mitad la concentración máxima inhibitoria (del 50 %) del compuesto.

Compuesto	IC ₅₀
Micanol	30 µM
KAJ	45 µM
Deoxo-geayine	16,5 µM
Quercetina	2,6 µM

En esta tabla se puede apreciar que el compuesto Deoxo-geayine es el que presenta un IC₅₀ mas bajo, al compararlo con los demás compuestos kauranos, lo que significa que se requiere una concentración menor de dicho compuesto para obtener una inhibición de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para este ensayo se utilizo la quercetina ya que es un compuesto ya comprobado como anti-inflamatorio, lo cual corresponde a los resultados obtenidos en este ensayo.

8. Determinación del potencial de captación de radicales libres mediante el uso del compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Los resultados mostrados a continuación corresponden a un ensayo libre de células llevado a cabo con los tres compuestos kauranos de interés, donde una solución del compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) fue mezclada con dichos compuestos para

conocer la capacidad de estos de donar un átomo de hidrógeno que origine la forma reducida del compuesto DPPH. Se utilizó como control positivo el ácido ascórbico el cual es un conocido compuesto anti-oxidante, siendo capaz de donar átomos de hidrógeno al medio, causando la reducción del DPPH. Gracias a este compuesto se corroboró el correcto funcionamiento de este método y además, sirvió para comparar los resultados obtenidos con los compuestos kauranos: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine.

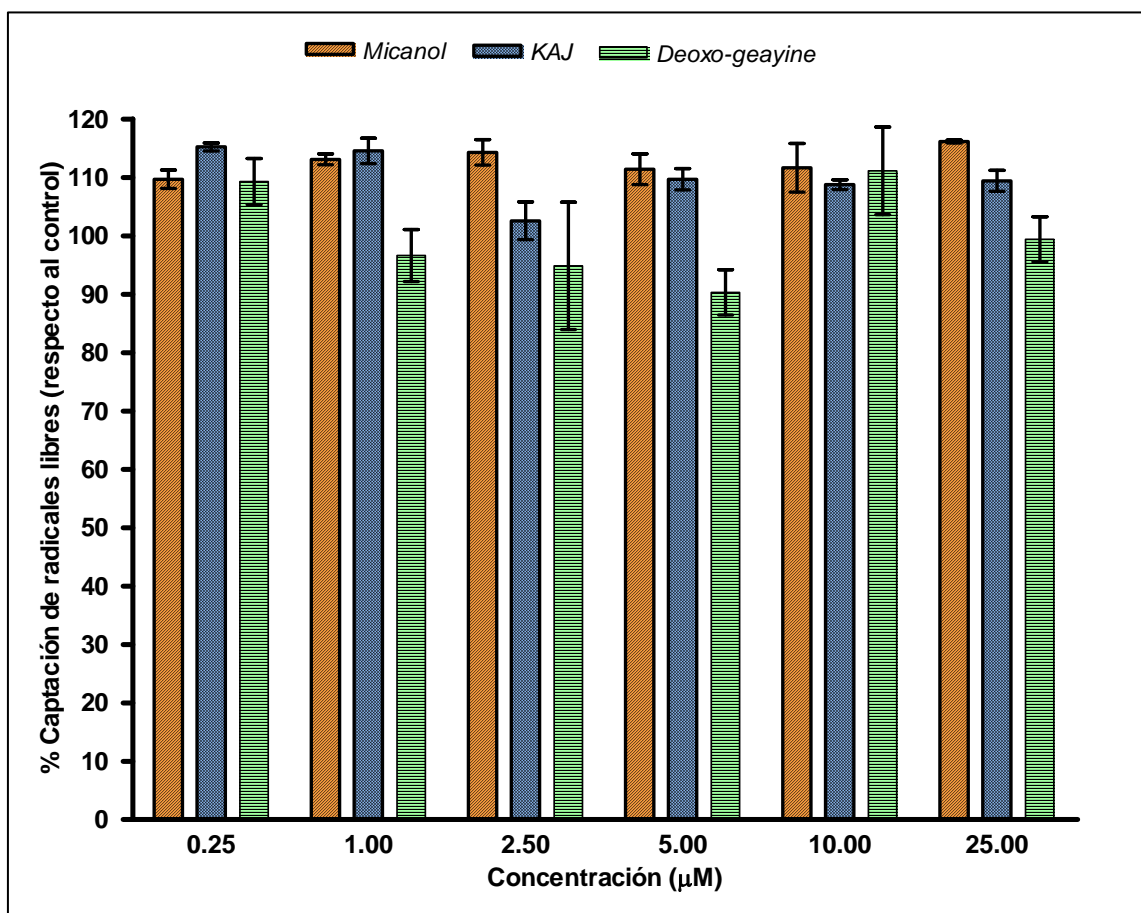


Figura 17. Determinación del potencial de captación de radicales libres mediante el uso de DPPH. En este ensayo libre de células, los compuestos kauranos se incubaron por 45 min. con el DPPH (radical libre) y se midió la disminución de la cantidad de radicales libres por métodos espectrofotométricos (n = 6). Los valores graficados representan el Promedio + S.D.

9. Ensayo de proliferación por citometría de flujo

Tabla 16. Determinación del efecto del Micanol, KAJ y Deoxo-geayine sobre la proliferación celular de las líneas leucémicas mediante técnicas de citometría de flujo.

Compuesto	Concentración (μM)	Porcentajes respecto al control (100%)	
		Jurkat E 6.1	U937
Micanol	2,5	68,86 \pm 0,07	102,29 \pm 1,70
	5	60,97 \pm 5,61	99,43 \pm 1,63
	10	61,80 \pm 3,39	79,01 \pm 6,79
	25	69,10 \pm 3,68	89,50 \pm 2,33
	50	61,07 \pm 0,64	90,27 \pm 4,45
	100	62,77 \pm 0,14	89,31 \pm 0,42
KAJ	2,5	88,32 \pm 1,34	88,55 \pm 2,12
	5	86,37 \pm 0,78	100,38 \pm 1,70
	10	90,27 \pm 2,05	88,36 \pm 0,78
	25	94,89 \pm 0,00	93,32 \pm 0,49
	50	63,26 \pm 2,83	99,24 \pm 3,25
	100	70,07 \pm 0,42	90,84 \pm 0,57
Deoxo-geayine	2,5	80,78 \pm 0,99	94,66 \pm 2,40
	5	84,67 \pm 7,35	90,65 \pm 1,63
	10	49,56 \pm 1,44	67,75 \pm 3,89
	25	72,02 \pm 3,11	85,50 \pm 1,13
	50	60,8 \pm 0,14	96,56 \pm 3,25
	100	79,81 \pm 2,40	91,03 \pm 2,33
Quercetina	2,5	72,99 \pm 0,85	104,01 \pm 3,46
	5	80,29 \pm 4,95	100,19 \pm 1,91
	10	78,59 \pm 0,07	99,62 \pm 1,41
	25	68,13 \pm 0,00	92,94 \pm 2,47
	50	66,91 \pm 1,06	71,95 \pm 1,06
	100	55,72 \pm 0,35	57,63 \pm 0,57

Los valores son el Promedio \pm S.D. para un $n = 4$, de la relación entre las intensidades medias de fluorescencia de las células tratadas y el control estimulado, expresados en términos porcentuales para cada línea celular individual. Los valores de referencia (controles) fueron tomados como 100% para ambas líneas celulares.

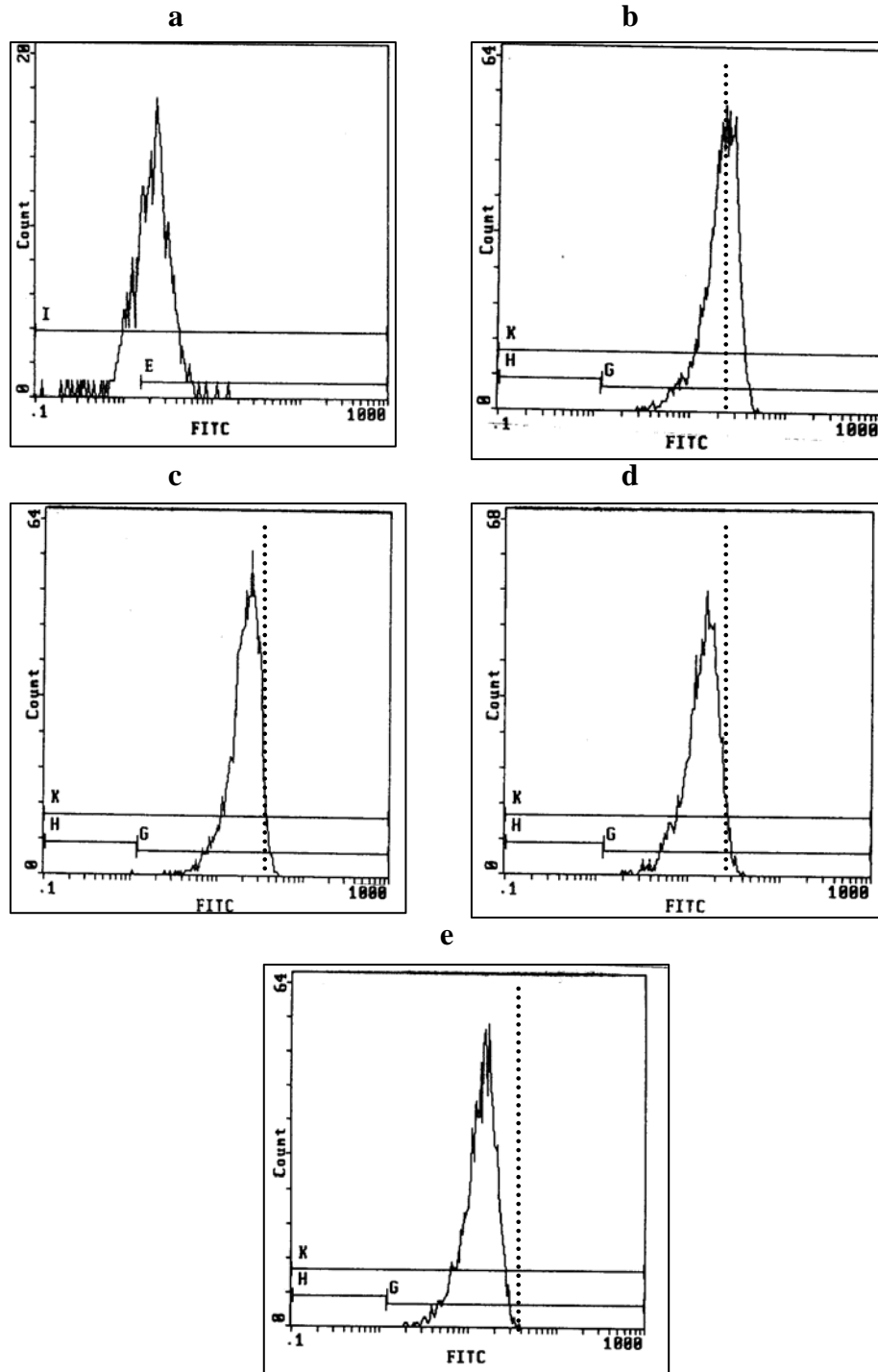


Figura 18. Histogramas de intensidad de fluorescencia contra conteo de células para la estimación de la proliferación de leucocitos humanos. En el gráfico **a** se observa el control de la proliferación; por otra parte tenemos al gráfico **b** que nos muestra la referencia del control basal (células estimuladas y no tratadas con ningún compuesto); los gráficos **c**, **d** y **e** corresponden a los resultados de los compuestos kauranos Micanol, KAJ y Deoxo-guayine respectivamente, nótese que las curvas se encuentran en la misma región que el control basal (gráfico b).

DISCUSION

En los últimos años se ha incrementado el número de trabajos publicados en el área de productos naturales con potencial efecto anti inflamatorio debido a la carencia de fármacos selectivos y específicos. En el presente trabajo se analizaron los Kauranos Micanol, KAJ y Deoxo-geayine como compuestos con el potencial de inhibir la respuesta inductora de radicales y proliferativa en cultivos primarios y líneas celulares humanas. El estudio previo, Carrera 2008, realizado con los compuestos kauranos Kaurenol, Kaurenal, Ácido kaurenico, Ácido grandiflorénico y 15- α -cinamoilkaurenico usando leucocitos humanos totales y las líneas celulares Jurkat E 6.1 y U937; y macrófagos múridos RAW 264.7 demostró que los kauranos tienen efectos importantes en la viabilidad, actividad captadora de radicales libres y proliferación celular. Los estudios se realizaron utilizando quercetina como control (Bors y col., 1990).

Ninguno de los compuestos analizados por Carrera, como los ensayados en éste trabajo (figura 14 y 17), fueron capaces de captar radicales de oxígeno y nitrógeno sugiriendo que los compuestos tienen efectos directos sobre las células induciendo cambios en el patrón de producción de radicales, viabilidad y proliferación celular.

En los estudios de viabilidad celular, el Micanol resultó ser el compuesto con el menor IC₅₀ encontrado en las células Jurkat E6.1 y las RAW 264.7, no así en la línea celular U937. Es interesante, el efecto del Micanol sobre la viabilidad se pierde a las 72 horas de cultivo. En cultivo primario, no se observó un efecto importante en la viabilidad celular utilizando los compuestos. De todo lo mencionado, se puede concluir que los compuestos, incluyendo el Micanol, no parecen ser potencialmente citotóxicos. Para definir si los compuestos por el contrario son citostáticos se realizaron los experimentos de

proliferación por citometría de flujo. Los experimentos mostrados en la tabla 16 y en la **figura 18** demuestran claramente que no hay cambios significativos del número de células en división y en consecuencia el efecto pareciera ser citostático.

Teniendo en cuenta que el efecto de los compuestos no es citotóxico, los resultados sobre la producción de óxido nítrico en células RAW, figura 13 y tabla 12 reflejan que el Micanol es el único compuesto capaz de inhibir la producción de óxido nítrico con un Ic_{50} menor a 50 μM .

La producción de peróxidos fue evaluada por dos técnicas, la de NBT, que mide esencialmente la producción de la NADPH oxidasa de membrana y la de citometría de flujo que mide la producción de peróxidos intracelular por citometría de flujo. No se observan diferencias en los ensayos de NBT por lo que el sistema holoenzimático no es inhibido por los compuestos en forma directa. Por otro lado, el efecto observado en los estudios de citometría de flujo indican que existe una disminución significativa en la producción intracelular de peróxido. Éstas diferencias podrían atribuirse a que los compuestos son capaces de inhibir los procesos de activación celular, efecto muy similar al observado por Carrera en el año 2008. Hay un reporte de Yang y col., del 2004, que refiere los efectos inhibitorios de los ent-kauranos purificados de la planta *Annona squamosa*. De allí que los efectos reportados en el presente trabajo pudieran ser de sumo interés.

Uno de los efectos importantes en la terapéutica actual es el uso de antioxidantes, pero no solo como moléculas captadoras de radicales sino inhibidoras de los procesos de daño por estenosis/reperfusión o envejecimiento celular (Lee y col., 2009; Bonacorsi y col., 2009; Kametani y col., 2006).

Muchos de los compuestos además que se usan en los procesos infecciosos virales o inflamatorios crónicos tienen dichas propiedades. Por ello, las estructuras deben ser evaluadas en la capacidad promotora de la maquinaria antioxidante aporte de los efectos que pudiera tener en la regulación de otras vías de activación de procesos inflamatorios como la secreción y activación de fosfolipasa A2 y ciclooxigenasa.

Las diferencias estructurales entre Micanol y Deoxo-geayine son sutiles. La incorporación de un grupo OH podría ser importantísimo en los procesos relacionados con la entrada del compuesto al interior celular o con los procesos ligados a la inhibición de las actividades enzimáticas. Sería interesante probar además si los efectos del Micanol son esteroespecíficos. Varios investigadores (Mukai y col., 2009; Berginc y col., 2009; Li y col., 2009) han postulado que varios compuestos con potencial antiinflamatorio extraídos de diferentes fuentes vegetales son capaces de modificar el transporte de drogas a través de las membranas (transportador ABC) o por el contrario, son capaces de inhibir la glicoproteína P que extruye compuestos tóxicos para las células. Ésta posibilidad también habría que explorarla in Vitro en las diferentes líneas celulares.

Se concluye entonces que los compuestos estudiados en el presente trabajo tienen efectos importantes en la inhibición de la producción de especies intracelulares de peróxido, no así sobre la producción de superóxido o de la viabilidad celular y solo el Micanol tuvo efecto en la producción de óxido nítrico. Estudios futuros deben realizarse para discernir el mecanismo de acción de los compuestos estudiados.

CONCLUSIONES

- Se observa una disminución de la viabilidad celular con los compuestos Micanol en cultivos de células Jurkat E6.1 de 24 hrs.
- Los compuestos analizados, no son citotóxicos en cultivos de 72 horas en las líneas celulares humanas Jurkat E 6.1, U937, y los macrófagos murinos RAW 264.7.
- La viabilidad de los leucocitos totales humanos no se ve afectada por los compuestos kauranos: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, a ninguna de las concentraciones evaluadas.
- De los compuestos analizados, el Micanol es el único compuesto capaz de inhibir la producción de óxido nítrico.
- De los resultados obtenidos por el método de reducción del NBT (el cual mide la actividad de la NADPH oxidasa de membrana), se concluye que el sistema holoenzimático no es inhibido por los compuestos kauranos en forma directa.
- En el ensayo de determinación de peróxido de hidrógeno intracelular por citometría de flujo, se pudo observar una disminución significativa en la producción intracelular de esta especie reactiva de oxígeno, por esto se concluye que dichos compuestos pudieran tener actividad inhibitoria de la producción de peróxido de hidrogeno.
- La actividad captadora de radicales libres evaluada por el uso del DPPH, mostró que los compuestos kauranos: Micanol, KAJ y Deoxo-geayine, no poseen actividad anti-oxidante.

BIBLIOGRAFIA

- Abramson S, Amin A, Clancy R and Attur M (2001). The role of nitric oxide in tissue destruction. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology** **15**: 831-845.
- Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim J and Abraham E (2004). Involvement of reactive oxygen species in Toll-Like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. **Journal of Immunology** **172**: 2522-2529.
- Baehner R, Boxer L and Davis J (1976). The biochemical basis of Nitroblue Tetrazolium, Reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. **Blood** **48**: 309-313.
- Balkwill F (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev** **25**: 409 -416.
- Bass D, Parce J, Dechatelet L, Szejda P, Seeds M and Thomas M (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology** **130**: 1910-1917.
- Bermejo A y Duarte J (2003). Mecanismos de transducción del lipopolisacárido (Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide). **ARS Pharmaceutica** **44**: 121- 139.
- Berginc K, Zakelj S, Ursic D and Kristl A (2009). Aged garlic extract stimulates p-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 mediated effluxes. **Biol Pharm Bull** **32**:694-699.
- Bonacorsi C, Raddi MS, Carlos IZ, Sannomiya M and Vilegas W (2009). Anti-Helicobacter pylori activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complement Altern Med** **9**:2.
- Bonaventura D, de Lima R, Vercesi J, da Silva R and Bendhack L (2006). Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology** **46**: 215-222.
- Bors W, Heller W, Michel C and Saran M 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology** **186**: 343-355.
- Caballero C (2004). Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre *Leptinotarsa decemlineata* (say) (coleoptera: chrysomelidae) y *Spodoptera exigua* (hübner) (lepidoptera: nocturnae). **Tesis doctoral** de la Universidad Politécnica de Madrid.
- Carrera O (2008). Posible efecto anti-inflamatorio de compuestos kauranos extraídos de exudado resinoso de plantas. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Choi H, Kim J, Cha Y.N and Kim C (2006). A quantitative Nitroblue Tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry** **27**: 31-44.

- Clardy J and Walsh C (2004). Lessons from natural molecules. **Nature** **432**: 829- 837.
- Di Giulio R (1991). Indices of oxidative stress as biomarkers from environmental contamination. **Aquatic toxicology and risk assessment**. Mayes / Barron Editors **14**: 15-31.
- Dirsch V, Stuppner H and Vollmar A (1998). The Griess assay: suitable for a bioguided fractionation of anti-inflammatory plant extracts. **Planta Medica** **64**: 423- 426.
- Duque R, Phan S, Hudson J, Till G and Ward P (1985). Functional defects in phagocytic cells following thermal injury, Application of flow cytometric analysis. **The American Journal of Pathology** **118**: 116-127.
- Esfandiari N, Sharma R, Saleh R, Thomas A and Agarwal A (2003). Utility of the Nitroblue Tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. **Journal of Andrology** **24**: 862-870.
- Ezeamuzie C and Taslim N (2006). Reactive oxygen species mediate phorbol ester-stimulated cAMP response in human eosinophils. **European Journal of Pharmacology** **543**: 174-180.
- Folkerts G, Kloek J, Muijsers R and Nijkamp F (2001). Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology** **429**: 251-262.
- Forman H and Torres M (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** **166**:S4-S8.
- Fraser I, Koziel H and Ezekowitz R (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. **Seminaries in Immunology** **10**: 363-372.
- Gannon C, Malone D and Napolitano L (2001). Reduction of IL-10 and nitric oxide synthesis by SR31747A (sigma ligand) in RAW murine macrophages. **Surgical Infections** **2**: 267-272.
- Goodwin T (1971). Algal carotenoids, Aspects of terpetioid chemistry and biochemistry. **Phytochemical Society Symposium** 315-356.
- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J and Tannenbaum S (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry** **126**:131-138.
- Janeway C, Travers P, Walport M and Shlomchik M (2005). **Immunobiology: The immune system in health and disease**, 6ta edición, Garland Science Publishing, New York, pp. 45-51, 52-54.
- Kametani R, Miura T, Harada N, Shibuya M, Wang R, Tan H, Fukagawa Y, Kawamura S and Matsuzaki M (2006). Carvedilol inhibits mitochondrial oxygen consumption and

superoxide production during calcium overload in isolated heart mitochondria. **Circ J** **70**:321-326.

- Keizers K and Davies-Coleman M (2005). Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. **Chemical Society Reviews** **34**: 355-365.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H and Moilanen E (2005). Nitric Oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy** **4**:471-479.
- Kovacs F (2003). Comunicación oral: “El efecto de la firmeza del colchón en la lumbalgia inespecífica crónica. Un ensayo clínico controlado, aleatorizado y a doble ciego”. **XXIII Congreso de la SemFYC**, España.
- Lara L, Rivera H, Pérez-P C, Blanca I, Bianco N and De Sanctis J (1997). Low density lipoprotein receptor expression and function in human polymorphonuclear leucocytes. **Clinical and Experimental Immunology** **107**:205-212.
- Lee SJ, Mun GI, An SM and Boo YC (2009). Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid. **BMB Rep** **30**:561-567.
- Lehmann A, Halstnesen A, Holst J and Bassoe C (1997). Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis. **Journal of Immunological Methods** **200**: 55-68.
- Li L, Stanton JD, Tolson AH, Luo Y and Wang H (2009). Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. **Pharm Res** **26**:872-882.
- Lund-Johansen F and Olweus J (1992). Signal transduction in monocytes and granulocytes measured by multiparameter flow cytometry. **Cytometry** **13**: 693-702.
- Luster A, Tager A (2004). T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. **Nature Reviews Immunology** **4**: 711-724.
- Lyons A and Parish C (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods** **171**:131-137.
- Marcocci L, Maguire J and Packer L (1994). Nitecapone: a nitric oxide radical scavenger. **Biochemistry and Molecular Biology International** **34**:531-541.
- Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** **26**:211-219.
- Moncada S, Higgs A and Furchgott R (1997). XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Reviews** **49**: 137-141.

- Mora S y Corado J (2003). **Inmunología Actual**, 2da edición, Alfa impresoras, Valencia, pp. 30-32, 49-52, 122-128.
- Moreno C y Sanchez-Ibarrola A (2003). Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. **Rev Med Univ Navarra** **47**: 29-33.
- Moshage H (1997). **Clinical Chemistry** (Editorial) **43**: 553-556.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. **65**:55-63.
- Mukai R, Satsu H, Shimizu M and Ashida H (2009). Inhibition of P-glycoprotein enhances the suppressive effect of kaempferol on transformation of the aryl hydrocarbon receptor. **Biosci Biotechnol Biochem**. **73**:1635-1639.
- Nagy G, Clark J, Buzás E, Gorman C, Cope A (2007). Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters** **111**: 1-5.
- Nathan C (2002). Points of control in inflammation. **Nature** **420**: 846-852.
- Olalye M and Rocha J (2007). Commonly used tropical medicinal plants exhibit distinct in vitro antioxidant activities against hepatotoxins in rat liver. **Experimental and Toxicologic Pathology** **58**:433-438.
- Parish C (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. **Immunology and Cell Biology** **77**:499-508.
- Pochechueva T, Galanina O, Ushakova N, Preobrazhenskaya M, Sablina M, Nifantiev N, Tsvetkov Yu V., Vozney Ya V., Imberty A and Bovin N (2004). Uncharged P-selectin blockers. **Glycoconjugate Journal** **20**: 91-97.
- Rainard P (1986). A colorimetric microassay for opsonins by reduction of NBT in phagocytosing bovine polymorphs. **Journal of Immunological Methods** **90**:197- 201.
- Ríos C, Bolis M y Salvatierra-González R (2004). **Legislación sobre antibióticos en América Latina**, Organización Panamericana de la Salud (Biblioteca Sede OPS) **309**:1-119.
- Rook G, Steele J, Umar S and Dockrell H (1985). A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. **Journal of Immunological Methods** **82**:161-167.
- Rysz J, Banach M, Stolarek R, Pasnik J, Ciałkowska-Rysz A, Markuszewski L and Baj Z (2006). TNF- α priming effect on polymorphonuclear leukocyte reactive oxygen species generation and adhesion molecule expression in hemodialyzed patients. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, **54**: 209- 215.

- Salvemini D, Doyle T and Cuzzocrea S (2006). Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. **Biochemical Society Transactions** **34**:965-970.
- Schmid I, Hausner M, Cole S, Uittenbogaart C, Giorgi J and Jamieson B (2001). Simultaneous flow cytometric measurement of viability and lymphocyte subset proliferation. **Journal of Immunological Methods** **247**:175-186.
- Soberón J, Quiroga E, Sampietro A y Vattuone M (2000). Giberelinas. **Hipertextos del área de la Biología** (Revista digital).
- Solomon E, Berg L, Martin D y Villae C (1996). **Biología de Villae**, 3ra edición, Interamericana Mc Graw – Hill, Mexico, pp 839-840.
- Sreejayan and Rao M (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology** **49**:105-107.
- Stewart L, Soileau J, Ribnicky D, Wang Z, Raskin I, Poulev A, Majewski M, Cefalu W and Cefalu T (2008). Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Metabolism** **57**: 39-46.
- Stöve S, Welte T, Wagner T, Kola A, Klos A, Bautsch W and Kohl J (1996). Circulating complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** **3**: 175- 183.
- Strassheim D, Asehnoune K, Park J.S, Kim J.Y, He Q, Richter D, Kuhn K, Mitra S and Abraham E (2004). Phosphoinositide 3-kinase and akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils. **The Journal of Immunology** **172**: 5727-5733.
- Suarez A, Blanco Z, Compagnone R, Salazar-Bookaman A, Zapata V, Alvarado C (2006). Anti-Inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology** **105**: 99-101.
- Suarez A, Compagnone R, Salazar-Bookaman A, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G (2003). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology** **88**: 11-14.
- Suárez A, Vásquez L, Manzano M, Compagnone R (2005). Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal** **20**: 611-614.
- Ushakova N, Preobrazhenskaya M, Bird M, Priest R, Semenov A, Mazurov A, Nifantiev N, Pochechueva T, Galanina O and Bovin N (2005). Monomeric and Multimeric Blockers of Selectins: Comparison of *in vitro* and *in vivo* Activity. **Biochemistry** **70**: 523–532.
- Ward P and Lentsch A (1999). The acute inflammatory response and its regulation. **Archives of Surgery** **134**:666-669.

- Washida K, Abe N, Sugiyama Y and Hirota A (2007). Novel DPPH radical scavengers, demethylbisorbibutenolide and trichopyrone, from a fungus. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** **71**:1052-1057.
- Yang YL, Chang FR, Hwang TL, Chang WT and Wu YC (2004). Inhibitory effects of entkauranes from the stems of *Annona squamosa* on superoxide anion generation by human neutrophils. **Planta Med** **70**:256-258.
- Zhang G and Ghosh S (2001). Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **The Journal of Clinical Investigation** **107**:13-19.

REFERENCIAS WEB CITADAS

- <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/lps.jpg> Sitio correspondiente al Programa de Postgrados en Ciencias Biomédicas Integradas de la Universidad de Carolina del Sur. Editado por Dr. Richard Hunt. Última actualización: 03 de septiembre del 2008. **Figura 2**. Última visita: 15 de abril de 2009.
- www.chinaphar.com/1671-4083/25/figs/977f1.jpg Es la revista oficial de la Sociedad Farmacológica China dirigida por Jian Ding, es una publicación de alta calidad, con artículos de investigación originales, comentarios y editoriales sobre todos los aspectos de la farmacología y las ciencias de la vida. Última actualización: Julio 2009. **Figura 4**. Última visita: 23 de abril de 2009.
- <http://www.lclabs.com/PRODFILE/P-R/P-1680.php4> Sitio que contiene los precios y la información técnica de los productos fabricados y vendidos por Laboratorios LC (División de Productos Farmacéuticos Procyon, S.A.). Última actualización Febrero 2009. **Figura 3**. Última visita: 12 de abril de 2009.
- http://www.nature.com/nri/journal/v4/n9/fig_tab/nri1438_F3.html El sitio “Nature Publishing Group” (NPG), publica revistas y bases de datos en línea a través de la vida, física y ciencias aplicadas, más recientemente sobre la medicina clínica. Contenido que abarca noticias diarias, la opinión de los expertos y la metodología práctica, de más alto nivel de investigación y de evaluación de impacto que cualquier editor de ciencias. Última Actualización: Octubre 2009. **Figura 1**. Última visita: 15 de abril de 2009