



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

“Obtención y actividad antiinflamatoria de flavonoides y terpenoides aislados de *Cayaponia tayuya* e *Isodon xerophilus*”

Tesista: Silvia Valeria Aquila

Directora: Dra. Silvia Laura Debenedetti

***Codirectores: Dr. José Luis Ríos Cañavate
Dra. Etilé Dolores Spegazzini***

2016

Dedicada a la niña pequeña que habita en mi

“... nuestras necesidades frustradas del pasado o nuestros miedos imaginarios nos mantienen insatisfechos en medio de una realidad potencialmente satisfactoria, pero (...) las personas pueden redescubrir el regalo que es vivir en un cuerpo dotado de una piel sensible, una respiración agradable y la posibilidad de un movimiento gozoso.”

Claudio Naranjo. *Ayahuasca. La enredadera del río celestial*

Agradecimientos

A Etile Spegazzini por adoptarme como aprendiz, por su ininterrumpido estímulo y por estar pendiente. Gracias.

A Silvia Debenedetti porque generó la posibilidad de que esta tesis pudiera realizarse y estuvo cuando la convoqué. Gracias.

A Mari Rosella, porque creyó más en mí que yo misma. Gracias!

A Guillermo Schinella, amigo, por ampliar mis horizontes y por esa cualidad natural tan suya que me impulsa a observar mi sombra y crecer. Gracias.

A José Luis Ríos Cañavate, mi codirector. Me dio espacio entre los suyos, me guió en el aprendizaje, me impulsó a producir, y cada vez que recurrí a él obtuve un sí. Por su disponibilidad y generosidad esta tesis es una realidad. - JL, gracias, gracias para siempre!

A mis compañeros de cátedra: Carlos, Mariela, Oscar, Luis, Betiana, Franco, Griselda, Valeria y Florencia; sin su colaboración hubiese sido más difícil. Gracias.

Recuerdo con mucho cariño a mis compañeros de laboratorio en Valencia: José Miguel, Ana, Isabel y Zen; a los del laboratorio de adelante: Noureddine, Isabel, Inma y Nadia; a los del laboratorio de al lado: Edu, Nicla, Miguel, Vanessa, Javier y Fermí. Y también a los profesores: Rosa Giner, Diego Cortés y Mari Carmen Recio. Gracias por compartir sus conocimientos y hacer de mi estancia en Valencia una experiencia inolvidable!

A mi amiga Velia; ella entiende de qué se trata la vida. Un gracias que trascienda tiempos y espacios!

Más amigos que me animaron: Letty, Lourdes, Gi, Iván, Lalelí, otra vez Carlos, Pablito, Chuli, Giselle y Zurita. Gracias. Compartir vida con ustedes me hace muy bien.

Hubo otras personas del ámbito académico cuyas intervenciones me encaminaron e impulsaron: Fernando Chirido, Alicia Consolini, Daniela Hozbor, Alan Talevi, Flavio Francini y Marina González. A todos, Gracias.

Esta tesis se realizó en el marco de la beca “Desarrollo y Optimización de metodologías analíticas para el control de calidad de medicamentos fitoterápicos y materias primas

de origen vegetal. Preparación de estándares”, otorgada por ANPCyT; y la beca “Jóvenes Investigadores de países en vías de desarrollo” otorgada por la Universidad de Valencia. Me siento profundamente agradecida con estas instituciones.

A mi mamá Katty, a mi hermana Sonia y a mi hermano Leonidas. Ellos son mi familia, ellos siempre están. Gracias, gracias, gracias.

“Escribir es como la segregación de las resinas; no es un acto, sino lenta formación natural.”

Gaspar Hernández. *No soy de este mundo*

Resumen

Esta tesis estudia compuestos pertenecientes a dos plantas utilizadas por la medicina tradicional como antiinflamatorias: *Isodon xerophilus* (C. Y. Wu et H. W. Li) H. Hara perteneciente a la familia Lamiaceae y endémica de la provincia de Yunnan, en China; y *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. de la familia Cucurbitaceae, que crece en el Amazonas.

4 diterpenoides *ent*-kauranos: xerophilusin A y B, longikaurin B y xerophilusin F que habían sido aislados previamente a partir de las hojas de *I. xerophilus*, en esta tesis son evaluados en su capacidad de afectar la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, mediante la utilización de ensayos *in vitro*, para determinar el potencial antiinflamatorio de estos compuesto.

El estudio con *C. tayuya* consistió en la obtención de una fracción enriquecida en flavonoides a partir de un extracto butanólico previamente obtenido de las raíces de la planta, la identificación de los flavonoides, y la evaluación de la fracción enriquecida en flavonoides mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* para comprobar el efecto antiinflamatorio y la influencia sobre mediadores y enzimas involucrados en el proceso inflamatorio.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron modelos de inflamación aguda y crónica en oreja de ratón inducida por aplicación tópica de TPA.

Los experimentos *in vitro* se realizaron con macrófagos murinos RAW 264.7. La fracción enriquecida en flavonoides fue estudiada en su efecto sobre la producción de NO y TNF- α , y sobre la expresión de iNOS y COX-2. Los cuatro *ent*-kauranos se investigaron en su capacidad de inhibir la degradación de I κ B, la translocación de NF- κ B al núcleo, la expresión de iNOS y la producción de NO.

Para esto se utilizaron técnicas cromatográficas (TLC, VLC, CC y HPLC) espectroscópicas (UV y NMR), y de biología molecular (WB, ELISA, inmunocitoquímica, RT-PCR, EMSA y gen reportero de luciferasa).

Los resultados obtenidos demuestran que la fracción enriquecida en flavonoides manifiesta efecto antiinflamatorio y que este efecto estaría mediado en parte, por inhibición de la expresión de iNOS y COX-2.

Y que los 4 *ent*-kauranos son agentes potencialmente antiinflamatorios mediante un mecanismo que inhibe la activación de NF- κ B con la consecuente disminución de los mediadores proinflamatorios implicados.

Publicaciones

Esta tesis doctoral dio lugar a las siguientes publicaciones:

Aquila S, Weng ZY, Zeng YQ, Sun HD, Ríos JL. Inhibition of NF- κ B activation and iNOS induction by *ent*-kaurane diterpenoids in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Natural Products*. 2009; 72(7): 1269-1272.

Aquila S, Giner RM, Recio MC, Spegazzini ED, Ríos JL. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 121(2): 333-337.

ÍNDICE

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	V
Publicaciones	VII
Abreviaturas	XII
Índice de figuras	XVIII
Índice de tablas	XX

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Inflamación: fisiopatología y tratamiento.....	1
I.2. Drogas y productos naturales como fuente de medicamentos.....	2
I.3. Búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios.....	8
I.4. Especies antiinflamatorias objeto de estudio.....	11
I.4.1. <i>Isodon xerophilus</i>	11
I.4.2. <i>Cayaponia tayuya</i>	11

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Inflamación.....	13
II.1.1. Descripción general de la respuesta inflamatoria.....	13
II.1.2. La ruta inflamatoria.....	20
II.1.2.1. Inductores y sensores.....	21
II. 1.2.2. Mediadores y efectores.....	27
II.1.3. Inflamación crónica.....	29
II.1.4. El macrófago.....	31
II.2. Óxido nítrico sintasa y óxido nítrico.....	34
II.3. Ciclooxigenasa y prostaglandinas.....	37
II.4. Factor nuclear de transcripción κ B.....	41
II.5. Tratamientos antiinflamatorios.....	45

II.6. Productos naturales con actividad antiinflamatoria.....	47
II.7. Especies objeto de estudio.....	53
II.7.1. <i>Isodon xerophilus</i> (C. Y. Wu et H. W. Li) H. Hara.....	53
II.7.1.1. Descripción botánica y distribución.....	53
II.7.1.2. Uso en medicina tradicional.....	57
II.7.1.3. Composición química.....	58
II.7.1.3.1. <i>ent</i> -kauranos.....	58
II.7.1.4. Propiedades farmacológicas.....	64
II.7.2. <i>Cayaponia tayuya</i> (Vell.) Cogn.....	65
II.7.2.1. Descripción botánica y distribución.....	66
II.7.2.2. Uso en medicina tradicional y/o popular.....	70
II.7.2.3. Composición química.....	71
II.7.2.3.1. Flavonoides.....	73
II.7.2.4. Actividad farmacológica.....	76
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
III.1. Objetivos generales.....	79
III.2. Objetivos específicos.....	80
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
IV.1. Compuestos estudiados.....	81
IV.1.1. <i>ent</i> -kauranos purificados a partir de <i>Isodon xerophilus</i>	81
IV.1.2. Fracción de <i>Cayaponia tayuya</i> enriquecida en flavonoides.....	82
IV.1.2.1. Identificación de los componentes.....	83
IV.2. Ensayos <i>in vivo</i>	86
IV.2.1. Animales de experimentación.....	86
IV.2.2. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA.....	86
IV.2.3. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicaciones múltiples de	

TPA.....	87
IV.3. Ensayos <i>in vitro</i>	88
IV.3.1. Macrófagos murinos RAW 264.7.....	88
IV.3.2. Ensayo de viabilidad celular. Citotoxicidad.....	89
IV.3.3. Determinación de NO.....	90
IV.3.4. Determinación de la producción de TNF- α	91
IV.3.5. Determinación de la inducción de iNOS y COX-2 por Western blot.....	92
IV.3.6. Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de Polimerasa de iNOS.....	98
IV.3.7. Determinación de la cinética de degradación de I κ B por Western blot.....	102
IV.3.8. Determinación de la cinética de translocación de p65 por Western blot.....	103
IV.3.9. Localización de p65 por inmunocitoquímica.....	104
IV.3.10. Evaluación de la translocación de NF- κ B por EMSA.....	105
IV.3.11. Expresión transitoria del gen que se halla bajo regulación de NF- κ B.....	109
IV.3.12. Análisis estadístico.....	113

V. RESULTADOS

V.1. Fracción enriquecida en flavonoides. Obtención y determinación de su composición.....	115
V.2. Ensayos <i>in vivo</i>	117
V.2.1. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA.....	117
V.2.2. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicaciones múltiples de TPA.....	118
V.3. Ensayos <i>in vitro</i>	119

V.3.1. Ensayos de viabilidad celular.....	119
V.3.1.1. <i>ent</i> -kauranos.....	119
V.3.1.2. Fracción enriquecida en flavonoides.....	120
V.3.2. Determinación de NO.....	121
V.3.2.1. <i>ent</i> -kauranos.....	121
V.3.2.2. Fracción enriquecida en flavonoides.....	121
V.3.3. Determinación de la producción de TNF- α	122
V.3.4. Determinación de la inducción de iNOS y COX-2 por Western blot.....	122
V.3.4.1. <i>ent</i> -kauranos.....	122
V.3.4.2. Fracción enriquecida en flavonoides.....	124
V.3.5. Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de Polimerasa de iNOS.....	125
V.3.6. Determinación de la cinética de degradación de I κ B por Western blot.....	126
V.3.7. Determinación de la cinética de translocación de p65 por Western blot.....	126
V.3.8. Localización de p65 por inmunocitoquímica.....	127
V.3.9. Evaluación de la translocación de NF- κ B por EMSA.....	129
V.3.10. Expresión transitoria del gen que se halla bajo regulación de NF- κ B.....	130
 VI. DISCUSIÓN	
VI.1. Respecto a los <i>ent</i> -kauranos.....	131
VI.2. Relativa a la fracción enriquecida en flavonoides.....	138
 VII. CONCLUSIONES.....	147
 VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	148

Abreviaturas

AGEs	<i>Advanced Glycation End Products</i>
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AP-1	<i>Activating Protein-1</i>
ATP	Adenosín Trifosfato
B	Blanco
BAFF	<i>B cell Activating Factor</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Control
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCL	<i>C-C Motif Chemokine Ligand</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cf	Concentración final
cGMP	<i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CLV	Cromatografía Líquida en Vacío
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
cPGES	<i>cytosolic Prostaglandin E Synthase</i>
CSPD	<i>Chemiluminescent Substrate for Alkaline Phosphatase Detection</i>
CYP450	Citocromo P ₄₅₀ (<i>Cytochrome P₄₅₀</i>)
DAMPs	<i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>
DAPI	<i>6,4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>
dATP	<i>deoxy-Adenosine-Triphosphate</i>
dCTP	<i>deoxy-Cytidine-Triphosphate</i>
ddUTP	<i>dideoxy-Uridine-Triphosphate</i>
dGTP	<i>deoxy-Guanosine-Triphosphate</i>

DHA	<i>Docosahexaenoic Acid</i>
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAc	DNA complementario
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	<i>deoxy-Thymidine-Triphosphate</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic Acid</i>
EtOAc	Acetato de etilo
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Fase Estacionaria
FEF	Fracción enriquecida en Flavonoides
FM	Fase Móvil
FPP	Farnesil pirofosfato
GAP	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate</i>
GGPP	Geranil geranilpirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HAcO	Ácido acético
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1 protein</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferón
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleucina
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IPP	Isopentil difosfato
IR	Infrarrojo
IRAKs	<i>IL-1 Receptor-Associated Kinases</i>
IRF	<i>Interferon-Regulatory Factor</i>
I κ B	<i>Inhibitor of κB</i>
KC	<i>Keratinocyte Chemoattractant</i>
LB	Luria Bertani
LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
LOX	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT β	<i>Lymphotoxin β</i>
LTs	Leucotrienos
MAL	<i>MyD88-Adapter-Like</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MD-2	<i>Myeloid Differentiation Protein-2</i>
MeOH	Metanol
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
mPGES	<i>microsomal o membrane associated Prostaglandin E Synthase</i>
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
mtNOS	<i>mitochondrial Nitric Oxide Synthase</i>

MTT	3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NALP3	<i>NACHT, leucine-rich repeats and pyrin domain containing protein</i>
NB	<i>Natural Product Botanical</i>
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NIK	<i>NF-κB Inducing Kinase</i>
NLRP3	<i>NACHT, leucine-rich repeats and pyrin domain containing protein</i>
NLRs	<i>NOD-Like Receptors</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
nNOS	<i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NP-40	Tergitol [®]
NP-PEG	<i>Natural Products-Polyethylene Glycol Reagent</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAMPs	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PARP-1	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PECAM	<i>Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PHA	Fitohemaglutinina (<i>Phytohemagglutinin</i>)
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>
PRRs	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship,</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>

RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
Rf	<i>Ratio of front</i>
RLHs	<i>RIG-Like Helicases</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNA _m	RNA mensajero
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
SARM	<i>Sterile α- and Armadillo- Motif- containing protein</i>
SB	<i>Sample Buffer</i>
SCSIE	<i>Servei Central de Suport a la Investigació Experimental</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SGLT-1	<i>Sodium-Dependent Glucose Transporter</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-Activated Kinase 1</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIR	<i>Toll-Interleukin-1 Receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing Adaptor Protein</i>
TK	<i>Thymidine kinase</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate</i>
<i>t_r</i>	tiempo de retención
TRAF6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>

Tris	<i>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol</i>
TXs	Tromboxanos
UBC13	<i>Ubiquitin-Conjugating enzyme 13</i>
UEV1A	<i>Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 Variant 1 isoform A</i>
UV	Ultravioleta
VAP	<i>Vascular Adhesion Protein</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VCL	<i>Vacuum Liquid Chromatography</i>
VE	<i>Vascular Endothelial Cell</i>
WB	<i>Western Blot</i>

Índice de Figuras

De la sección Revisión bibliográfica

Figura 1. Fase temprana de la inflamación aguda.....	14
Figura 2. Etapa tardía de la inflamación aguda.....	17
Figura 3. Derivados de lípidos de membrana. Mediadores proinflamatorios: PAF, PGs y LTs, y proresolución: lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas.....	19
Figura 4. Componentes de la ruta inflamatoria.....	20
Figura 5. Activación de receptores TLR-4 por LPS.....	22
Figura 6. Transducción de la señal por receptores TLR4.....	24
Figura 7. Papel de la COX en la producción de prostaglandinas.....	38
Figura 8. Activación de NF- κ B por la vía clásica.....	42
Figura 9. Activación de NF- κ B por la vía alternativa.....	44
Figura 10. <i>Isodon xerophilus</i>	54
Figura 11. A) Estructura química del isopreno; B) Generación de precursores para la síntesis de terpenoides.....	59
Figura 12. Síntesis de terpenoides.....	60
Figura 13. Núcleos químicos de diterpenoides cíclicos.....	61
Figura 14. Estructura química del primer kauranoide aislado con nombre trivial kaureno y estructura del núcleo químico común a todos los kauranoides.....	62
Figura 15. Estructuras químicas comunes de kauranos y <i>ent</i> -kauranos. Destacan las diferencias en la configuración espacial.....	62
Figura 16. <i>Cayaponia tayuya</i>	68
Figura 17. Especimen de herbario de <i>Cayaponia tayuya</i>	69
Figura 18. Estructura química del esqueleto cucurbitano.....	72
Figura 19. Estructuras químicas de esqueletos chalcona, γ -pirona y flavonoide.....	74
Figura 20. Estructura de los núcleos químicos de las subclases de flavonoides.....	75

De la sección Resultados

Figura 1. TLC en silicagel de la FEF.....	116
Figura 2. Separación por HPLC de la FEF de raíces de <i>Cayaponia tayuya</i>	116
Figura 3. TLC en poliamida de algunas de las fracciones obtenidas de la	

FEF sometida a VLC.....	117
Figura 4. Efecto de la FEF sobre el edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA.....	118
Figura 5. Efecto de la FEF sobre el edema subcrónico en oreja de ratón inducido por TPA.....	119
Figura 6. % de viabilidad de las células RAW 264.7.....	120
Figura 7. Efecto de la FEF sobre la producción de NO.....	121
Figura 8. Efecto de la FEF sobre la producción de TNF- α	122
Figura 9. Efecto de 1, 2, 3 y 4 sobre la expresión de iNOS.....	123
Figura 10. Efecto de la FEF sobre la expresión de iNOS y COX-2.....	124
Figura 11. Efecto de 1, 2, 3 y 4 sobre la expresión de mRNA de iNOS.....	125
Figura 12. Efecto de los <i>ent</i> -kauranos sobre la degradación de I κ B.....	126
Figura 13. Efecto de los <i>ent</i> -kauranos sobre la translocación de p65.....	127
Figura 14. Inmunofluorescencia de p65.....	128
Figura 15. Efecto de los compuestos 1, 2, 3 y 4 sobre NF- κ B detectado mediante el ensayo de EMSA.....	129
Figura 16. Efecto de los <i>ent</i> -kauranos sobre la actividad transcripcional de NF- κ B detectada mediante actividad luciferasa.....	130

De la sección Discusión

Figura 1. Estructuras químicas de los 4 <i>ent</i> -kauranos estudiados en esta tesis.....	131
---	-----

Índice de Tablas

De la sección Revisión bibliográfica

Tabla 1. Principales mediadores inflamatorios y sus categorías.....28

Tabla 2. Principales AINEs. Clasificación.....46

De la sección Materiales y Métodos

Tabla 1. Protocolo para la mezcla de reacción de EMSA.....107

De la sección Resultados

Tabla 1. CI₅₀ de 1, 2, 3 y 4 sobre la viabilidad de RAW 264.7.....120

Tabla 2. CI₅₀ de 1, 2, 3 y 4 sobre la producción de NO en RAW 264.7.....121

De la sección Discusión

Tabla 1. Estructura química de los flavonoides que constituyen la FEF.....140

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Inflamación: fisiopatología y tratamiento

La reacción inflamatoria constituye el despliegue de una serie de respuestas defensivas producidas en los tejidos frente a la presencia de agentes patógenos (bacterias, virus, parásitos y hongos), agentes físicos como radiaciones, agentes químicos (venenos y toxinas), traumatismos (daños físicos) y cuerpos extraños. El objetivo es eliminar al agente y los tejidos dañados (Hall *et al.*, 2001). En términos generales, la inflamación controlada es una respuesta beneficiosa que defiende y protege al organismo de efectos nocivos (Wang *et al.*, 2013a). En circunstancias normales, la respuesta inflamatoria se resuelve. La resolución de la inflamación requiere la finalización de las rutas de señalización pro-inflamatorias, y la eliminación de células inflamatorias, seguido de la restauración de la función normal del tejido (Recio *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunas circunstancias, estas respuestas defensivas pueden actuar inadecuadamente, contra sustancias inocuas externas al organismo (polen, ácaros, alimentos, algunos fármacos) o contra sustancias endógenas (tejidos propios del organismo), donde las propias respuestas producen daño y forman parte del proceso de la enfermedad. Las respuestas defensivas no deseadas se llaman reacciones alérgicas o de hipersensibilidad, algunos ejemplos son shock anafiláctico, asma, artritis reumatoide, aterosclerosis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y colitis ulcerosa (Rang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013a). El proceso inflamatorio, por lo tanto, incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos, y cada tipo de estímulo desencadena un patrón característico de respuesta que constituye una variante del mismo fenómeno. A nivel macroscópico, los signos clínicos que acompañan la respuesta inflamatoria son eritema, edema y dolor (Brunton y Chabner, 2011) y hay interferencia o alteración de la función, como el espasmo del músculo liso bronquial que se produce en el asma o la restricción del movimiento en una articulación inflamada por artritis (Rang *et al.*, 2012).

El principal objetivo de la terapéutica antiinflamatoria es aliviar los síntomas, particularmente el dolor y la inflamación. Entre los fármacos más ampliamente utilizados se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) debido a sus excelentes efectos

farmacológicos y rápido inicio de acción; sin embargo, ninguno de ellos es ideal para regular o modificar los signos y los síntomas de la inflamación debido a la aparición de efectos adversos y a la pérdida de eficacia (Recio *et al.*, 2012). Todos los AINEs actualmente disponibles pueden tener efectos indeseados significativos, en especial alteraciones gastrointestinales, reacciones cutáneas, insuficiencias renales y menos frecuentemente, alteraciones de la médula ósea y alteraciones hepáticas (Rang *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2013a), lo cual constituye un desafío para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

I.2. Drogas y productos naturales como fuentes de medicamentos

Por muchas décadas las plantas fueron la principal fuente de fármacos para uso humano y los remedios herbarios y sus extractos se usaron ampliamente para aliviar o curar enfermedades. Como ejemplo se puede mencionar el uso del opio (obtenido de las cápsulas de *Papaver somniferum* L.) como analgésico, la quina (corteza de *Cinchona calisaya* Wedd.) para el tratamiento de la malaria, Ma Huang (sumidad de *Ephedra sinica* Stapf.) para el alivio del asma, o las famosas hojas de digital o dedalera (*Digitalis purpurea* L.) como tónico cardíaco. La ciencia moderna demostró la presencia de morfina, quinina, efedrina y digitoxina, respectivamente, en esas plantas medicinales, avalando su uso en la antigua medicina (Ríos *et al.*, 2009; Mishra y Tiwari, 2011).

Los productos naturales continúan siendo una importante fuente de nuevas estructuras en la búsqueda de nuevos fármacos o profármacos. El proceso de descubrimiento comienza con el ensayo de extractos crudos en animales o con bioensayos *in vitro*, seguido por el fraccionamiento guiado por bioactividad, con el objetivo de aislar e identificar el compuesto activo. El papel importante e incluso predominante de los productos naturales como fuente de fármacos se hace evidente tras consultar cualquier formulario nacional actual, y ha sido ampliamente documentado en una cantidad de revisiones recientes. En su revisión completa sobre el tema, Fabricant y Farnsworth identificaron 122 compuestos químicos que fueron obtenidos a partir de 94 especies de plantas y que son utilizados a nivel mundial como fármacos. También demuestran que el 80% de éstos, han tenido un uso en medicina tradicional idéntico o relacionado con el actual uso de los compuestos activos

de la planta, validando así este enfoque en el descubrimiento de fármacos modernos (Sucher, 2013). Investigaciones más recientes han conducido al aislamiento de principios activos de plantas con uso tradicional, entre ellos puede mencionarse el paclitaxel, obtenido de las hojas de *Taxus brevifolia* Nutt., y un ejemplo particularmente sorprendente de identificación de compuesto activo a partir del uso etnomedicinal, basado en la lectura de antiguos textos médicos chinos, fue el aislamiento de artemisinina a partir de la planta medicinal *Artemisia annua* L.

La historia de la artemisinina se inició en el marco de la Revolución Cultural en China como una iniciativa gubernamental para ayudar a vietnamitas del norte en la guerra contra los Estados Unidos. Durante la contienda, la malaria causada por *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina fue un problema importante que estimuló los esfuerzos de investigación en ambos lados del campo de batalla. En los EE.UU., estos esfuerzos culminaron en el descubrimiento de mefloquina, un compuesto que fue efectivo en dosis única contra los parásitos resistentes. Sin embargo, Vietnam del Norte que carecía de infraestructura en investigación se volvió hacia China en busca de ayuda. Bajo las instrucciones del Presidente Mao y del primer ministro Zhou, se realizó una reunión el 23 de mayo de 1967 en Beijing para discutir la problemática, la cual dio lugar a un programa nacional secreto denominado Proyecto 523 en el que participaron más de 500 científicos de 60 laboratorios e institutos. Debido a la condición secreta del proyecto, no hubo comunicaciones que informaran acerca del desarrollo de la investigación. Por primera vez, en octubre de 1981, la doctora Youyou Tu, principal investigadora del Instituto de Materia Médica China de la Academia China de Ciencias Médicas Chinas fue elegida para presentar en Beijing el trabajo del Proyecto 523 a un grupo de representantes de la Organización Mundial de la Salud dedicado al estudio de la quimioterapia en malaria. En enero de 1969, había comenzado a dirigir al equipo en la selección de literatura y recetas de la medicina tradicional china que pudieran presentar actividad antimalárica. Durante su búsqueda, la Dra. Tu y colaboradores investigaron más de 2.000 recetas de plantas tradicionales chinas y reunieron 640 que podrían tener alguna actividad antimalárica. Probaron más de 200 recetas con plantas tradicionales chinas y 380 extractos en un modelo de paludismo en roedores. Entre los resultados más prometedores destacaron los extractos de *A. annua*, ya que inhibieron el crecimiento del parásito en un 68%. Sin embargo,

estudios complementarios, sólo lograron entre 12% y 40% de inhibición. La Profesora Tu supuso que la pobre inhibición podría deberse a una baja concentración del principio activo en la preparación y comenzó a mejorar los métodos de extracción. Después de leer la antigua descripción medicinal china: "tomar un manojo de *Qinghao*, remojar en dos *sheng* (0,4 litros) de agua, estrujarlo para obtener el jugo e ingerir en su totalidad" en El Manual de Prescripciones para Tratamientos de Emergencia de Ge Hong (283-343 d.C.) de la Dinastía Jin, comprendió que los métodos tradicionales de extracción mediante ebullición y altas temperaturas podrían dañar el ingrediente activo. De hecho, obtuvieron un extracto mucho mejor después de cambiar el disolvente extractivo de etanol a éter etílico, utilizando temperaturas aún más bajas. Sin embargo, el extracto todavía era tóxico. Posteriormente se eliminó del extracto una fracción ácida que no presentaba actividad antimalárica, resultando un extracto neutro con toxicidad reducida y una mayor eficacia. El extracto neutro, denominado extracto número 191, se ensayó en un modelo de malaria en ratón, y logró una inhibición del 100% sobre *Plasmodium berghei* en octubre de 1971. Ella presentó sus resultados en una reunión celebrada en Nanjing el 8 de marzo de 1972, proporcionando parámetros críticos a otros equipos que formaban parte del proyecto. Dos grupos (dirigidos por Zeyuan Luo, del Instituto Yunnan de Investigación de Drogas y por Zhangxin Wei, del Instituto Shandong de Medicina Tradicional China), utilizando los métodos e información aportados, obtuvieron cristales puros que fueron altamente activos contra los parásitos de malaria murina. Los ensayos en seres humanos dirigidos por Guoqiao Li, de la Universidad Guangzhou de Medicina Tradicional China, se hicieron utilizando cristales de artemisinina obtenidos por el grupo de Luo; trataron 2099 casos producidos por *P. vivax* y *P. falciparum* (en proporción 3:1) con diferentes formas farmacéuticas de artemisinina, logrando la cura clínica de todos los pacientes; también trataron 143 casos de *P. falciparum* resistente a cloroquina y 141 casos de malaria cerebral con buenos resultados. Los criterios para considerar actividad terapéutica aceptable consistían en el retorno a la temperatura corporal normal dentro de las 72 h y a la eliminación de formas asexuales del parásito, evaluada en frotis sanguíneos, dentro de las 120 h de iniciado el tratamiento. La publicación que describe la dilucidación de la estructura cristalina por rayos-X, la farmacología y la eficacia de artemisinina contra malaria no severa y malaria cerebral severa, fue publicado en diciembre de 1979 en The Chinese Medical Journal con el título de "Antimalaria studies on

qinghaosu”, y en ella los autores no están enumerados, en su lugar están identificados como Coordinación del Grupo de Investigación del Antimalárico Qinghaosu (Klayman, 1985; Miler y Su, 2011).

El Premio Nobel 2015 en Fisiología y Medicina fue un premio compartido, y la mitad fue otorgado a la Profesora Tu, en reconocimiento a su trabajo y contribución a la salud mundial: la artemisinina salvó millones de vidas, y reivindica además a la medicina tradicional y al uso de plantas como fuente de inspiración de nuevos fármacos (Normile, 2015).

Otros fármacos de interés en la terapéutica actual lo constituyen las estatinas. Éstas conforman un grupo de medicamentos empleados inicialmente por su efecto hipocolesterolémico, y el avance de las investigaciones sobre sus propiedades farmacológicas ha permitido determinar que estos compuestos exhiben a la vez importantes efectos pleiotrópicos (Zhou y Liao, 2010; Miller y Martin, 2016). Su origen se debe al investigador japonés Akira Endo; con el objetivo de descubrir sustancias producidas por hongos como mecanismo defensivo, capaces de inhibir la síntesis bacteriana de colesterol, evaluó en un plazo de dos años un total de 6.000 hongos, tarea que resultó en el aislamiento de la primera estatina, denominada mevastatina, a partir de *Penicillium citrinum* en 1971 (Mostaza Prieto, 2008). Otras estatinas naturales descubiertas fueron aisladas de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Monascus* y *Pleurotus* (Moore *et al.*, 1985; Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). Las primeras estatinas además de ser producidas por hongos nativos fueron obtenidas por procesos fermentativos: la biotecnología ha desempeñado un papel fundamental en lo que respecta a la optimización de las condiciones para favorecer la biosíntesis de estos bioactivos. Estas estatinas de origen natural son conocidas como de tipo I. A partir de los conocimientos obtenidos del estudio de su relación estructura actividad, surgieron las estatinas de tipo II, semisintéticas, como producto de diversas investigaciones en busca de un medicamento hipocolesterolémico, con una acción farmacológica potenciada con respecto a las estatinas naturales; esta nueva clase de estatinas más potentes, comparte únicamente la porción responsable de su acción inhibitoria con las de tipo I (Nieto-Ramírez *et al.*, 2013). El descubrimiento de este grupo farmacológico, constituido por productos naturales y productos de síntesis inspirados en ellos, indudablemente es uno

de los que más contribuyó a la reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular durante los últimos años.

Otros datos confirman lo expuesto: de los 25 agentes farmacéuticos de mayor venta en el mundo, 12 son derivados de productos naturales. Entre 1981 y 2002, el 61% de las 877 nuevas entidades químicas introducidas como fármacos en todo el mundo, son o se inspiraron en productos naturales. Durante el periodo comprendido entre los años 2008 a 2013, 25 productos naturales o compuestos derivados de ellos fueron aprobados para su uso. En marcado contraste, ningún compuesto obtenido *de novo* por química combinatoria fue aprobado como un fármaco dentro de este período de tiempo. No obstante, las ventajas percibidas de la química combinatoria parecían ser mayores que las conocidas dificultades asociadas con el descubrimiento de fármacos basados en productos naturales (Sucher, 2013; Katz y Baltz, 2016).

Los fármacos antiinflamatorios también tienen su origen en las plantas. La corteza de *Salix alba* L. (Salicaceae), o sauce blanco, se usó desde tiempos inmemoriales. Los indígenas americanos centraron en ella la base de sus tratamientos médicos. El médico griego Hipócrates escribió ya en el siglo V a.C. acerca de sus propiedades medicinales cuando recomendaba una poción de la corteza de *S. alba* para el alivio del dolor y la fiebre; usos que después fueron recomendados por Plinio, Dioscórides y Galeno, y luego, a lo largo de muchos cientos de años, olvidados y redescubiertos de forma recurrente hasta que, mediado el siglo XVIII, el reverendo Edward Stone llevó a cabo con gran éxito un cierto “ensayo clínico” con cincuenta pacientes, cuyo resultado como antifebril comunicó en la Real Sociedad de Medicina Inglesa en 1763. Hubo que aguardar casi un siglo hasta que Johann A. Buchner, profesor de Farmacia en la Universidad de Múnich aisló en 1828 el principio activo de la corteza de sauce, describiéndolo como una sustancia amarga y amarillenta, en forma de agujas cristalinas a la que llamó salicina. En 1829, Henry Leurox aisló la salicina con alto rendimiento, y fue Raffaele Piria (químico italiano de La Sorbona) en 1838 que convirtió la salicina, por hidrólisis oxidativa, en cristales incoloros denominándolos ácido salicílico. Este compuesto también fue obtenido de *Spiraea ulmaria* (L.) Maxim. (sin: *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., Rosaceae) o reina de los prados. Los efectos adversos del ácido salicílico y su sabor amargo llevaron al francés Gerhardt, en 1853, y el alemán Kraut, en 1869 a sintetizar el ácido acetil salicílico. Pero fue el 10 de

octubre de 1897, la fecha en que, según el cuaderno de laboratorio de Felix Hoffmann, se dató el proceso de acetilado del ácido salicílico, que se comercializó bajo el nombre de ‘Aspirina’ por el laboratorio Bayer; aunque como ha quedado señalado anteriormente, la bibliografía había citado su preparación bruta por Gerhardt y, posteriormente, por Kraut. La aspirina fue introducida por Dreser y le dio el nombre con el que este medicamento ha llegado hasta nuestros días: “a” por acetilado, “spir” por *Spiraea* e “ina” una terminación común que se da a los fármacos (Municio, 2000; Sneader, 2000; Fuster y Sweeny, 2011).

Casos más sorprendentes resultaron los del tramadol y naproxeno, sustancias que fueron obtenidas por síntesis, en las que se comprobó actividad analgésica y comenzaron a tener uso terapéutico, y que años más tarde fueron identificadas entre los metabolitos secundarios de ciertas plantas. El tramadol fue fabricado por primera vez por la compañía farmacéutica Grünenthal GmbH (Alemania) y su uso clínico ocurrió a finales de 1970; actualmente es utilizado en todo el mundo para el tratamiento sintomático del dolor de intensidad moderada a severa. Fue diseñado por una simplificación de la estructura de la morfina, que mantiene los grupos responsables del efecto analgésico de la molécula, con intención de hacer mínimos los efectos indeseados de adicción y somnolencia. Más de cuarenta años después, en el marco de un proyecto de investigación orientado al descubrimiento de productos naturales con actividad analgésica, mediante el aislamiento bio guiado por actividad nociceptiva, a partir de un extracto en metanol de corteza de raíz de *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae), fue identificada entre otros alcaloides presentes, una sustancia cuya estructura química resultó ser la del conocido tramadol. En Camerún, África, *N. latifolia* es utilizada para el tratamiento del dolor, malaria, fiebre, epilepsia y convulsiones infantiles; de este modo, el insólito descubrimiento justifica el uso tradicional de la planta medicinal para el alivio del dolor (Boumendjel *et al.*, 2013).

El naproxeno también es un fármaco de síntesis; miembro de la familia de los AINEs, fue originalmente desarrollado por la compañía farmacéutica Syntex (integrada al grupo Roche en 1994) y aprobado para su uso por prescripción médica en 1976 en Estados Unidos. Actualmente el fármaco está indicado en el tratamiento de procesos dolorosos inflamatorios agudos (Aleve®, 2014). Sin embargo, el naproxeno también existe naturalmente. Fue aislado e identificado a partir de un extracto en cloroformo de rizomas de

plantas de seis meses de edad de la especie *Musa acuminata* Colla (Musaceae), conocida también con el nombre de platanera (Abad *et al.*, 2000).

I.3. Búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios

El proceso de investigación y desarrollo de un nuevo medicamento es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias, siendo desechadas la mayoría en distintas etapas del proceso. La complejidad del proceso es manejada por una diversidad de disciplinas científicas. En promedio, el estudio y el ensayo de un nuevo fármaco duran entre 12 y 15 años y significa una inversión cercana a los 600 millones de US\$ antes de que éste sea aprobado para su comercialización. Además, sólo 1 de cada 5.000 fármacos que entra en etapa de ensayos pre-clínicos será aprobado para uso en terapéutica (Marovac, 2001). Por lo tanto, una tarea que enfrenta la industria farmacéutica es proporcionar nuevos agentes que tengan claras ventajas sobre las terapias existentes.

Sobre la base de que muchos fármacos tienen su origen en productos naturales y que éstos han servido como excelentes compuestos líderes, el estudio de los productos naturales se utiliza ampliamente como método para encontrar nuevos compuestos cabeza de serie. Así, extractos de plantas, organismos marinos, toxinas animales y cultivos microbianos son utilizados en ensayos de actividad farmacológica en búsqueda de nuevas moléculas. Para este objetivo es necesario haber identificado y desarrollado un modelo experimental para la actividad objeto de estudio, que permita seleccionar las moléculas activas. Si un extracto da positivo, se trata de aislar el o los componentes responsables de la actividad, esperando que sirvan como compuestos líderes.

El interés en el análisis de los productos naturales se basa esencialmente en dos fortalezas, una de ellas, la gran cantidad de antecedentes como fuentes de moléculas líderes, y por otro lado, la diversidad estructural de las moléculas (metabolitos secundarios) producidas por los organismos, debido a la interacción entre estos y su medio ambiente para mejorar su supervivencia y competitividad (Mishra y Tiwari, 2011).

En la búsqueda de nuevos antiinflamatorios, muchos compuestos derivados de plantas han sido investigados en su actividad antiinflamatoria *in vivo* y en los mecanismos de acción involucrados, centrandó el foco en la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios y en la inhibición de la expresión de enzimas y de la activación de factores de transcripción implicados en las respuestas inflamatorias (Risitano *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2015; Limtrakul *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015).

En los procesos inflamatorios participan mediadores como citocinas y radicales libres. Otros mediadores están constituidos por los metabolitos del ácido araquidónico, siendo las prostaglandinas y los leucotrienos los más relevantes, aunque tromboxanos y lipoxinas también son importantes. Como la formación de esos compuestos requiere de la liberación previa del ácido araquidónico, su inhibición puede lograrse afectando la enzima responsable de su liberación, o las enzimas implicadas en su metabolización. Entre los mediadores que son radicales libres destacan el NO (*Nitric Oxide* en inglés) y ROS (*Reactive Oxygen Species* en inglés) tales como peroxinitrito, hidroxilo y superóxido. La estrategia aplicada sobre ellos implica prevenir su formación y liberación, inhibiendo la correspondiente enzima o secuestrando al radical después de producido. Entre las enzimas involucradas en los procesos inflamatorios, PLA₂ (*Phospholipase A₂* en inglés), COX (ciclooxigenasa), LOX (lipoxigenasa) y NOS (*Nitric Oxide Synthase* en inglés), han sido las más ampliamente estudiadas (Ríos *et al.*, 2009). La PLA₂ cataliza la hidrólisis de fosfolípidos celulares liberando ácidos grasos esterificados en el carbono 2 del glicerol, entre ellos, el ácido araquidónico. A partir del ácido araquidónico la 5-LOX es responsable de la biosíntesis de leucotrienos y la COX está implicada en la producción de prostaglandinas. La NOS genera NO a partir de L-arginina.

El factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) regula la expresión de varios genes implicados en las respuestas inflamatorias e inmunes. Además, estudios recientes han comenzado a dilucidar vías moleculares que vinculan inflamación y cáncer. Los estudios moleculares sobre NF- κ B resultan muy importantes para entender la patogénesis de estas enfermedades, y lo vuelven una diana óptima de terapias antiinflamatorias, inmunosupresoras y antineoplásicas, donde el objetivo consiste en identificar nuevos

fármacos que inhiben la activación de NF- κ B (Giuliani *et al.*, 2001; Colotta *et al.*, 2009; Wong y Tergaonkar, 2009; Aravindaram y Yang, 2010).

En el campo de los productos naturales, principalmente flavonoides, terpenoides y alcaloides, fueron identificados como inhibidores específicos de la actividad de PLA₂; flavonoides, terpenoides y curcuminoides como inhibidores de la expresión de COX; y compuestos fenólicos como el resveratrol, la curcumina, flavonoides y compuestos relacionados, cumarinas, lignanos, lactonas sesquiterpénicas, diterpenoides y triterpenoides, como inhibidores de la expresión de NOS a nivel del factor de transcripción (Ríos *et al.*, 2009). Mayoritariamente, flavonoides y terpenoides se han estudiado extensamente como agentes farmacológicos y muchos de ellos poseen propiedades específicas y selectivas como agentes antiinflamatorios.

Las condiciones inflamatorias en determinados órganos conducen a un incremento en el riesgo de desarrollo de cáncer (Grimm *et al.*, 2013). Las enfermedades que involucran inflamaciones en el tracto gastrointestinal tales como la hepatitis viral, colitis ulcerosa, o el esófago de Barret, aumentan considerablemente el riesgo de cáncer en los sitios inflamados. Muchos de los mediadores específicos, las enzimas involucradas en su producción y los factores de transcripción genética que se asocian con procesos inflamatorios, han sido directamente relacionados con la carcinogénesis. De tal manera que trabajos recientes determinaron que el factor nuclear de transcripción NF- κ B regula muchas rutas de señalización en inflamación y cáncer, concluyendo que la serie de genes involucrados en los procesos inflamatorio y tumoral están influenciados por NF- κ B (DuBois, 2003; Grau de Castro, 2005; Ríos *et al.*, 2009; Colotta *et al.*, 2009; Wang y DuBois, 2010; Ma *et al.*, 2013; O'Sullivan *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta la relación existente entre las rutas de señalización de los procesos inflamatorios y carcinogénesis, es altamente probable que compuestos de origen natural con actividad antitumoral exhiban también actividad antiinflamatoria y viceversa. Muchos compuestos de origen natural que presentan ambas actividades (antiinflamatoria y antitumoral) han sido aislados de plantas con uso tradicional como anticancerosas (Ma *et al.*, 2013; Orlikova *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos curcumina, resveratrol, baicaleina y cirsiol entre otros, han demostrado una marcada actividad antiinflamatoria *in*

vitro o *in vivo* y citotóxica en diferentes ensayos en cultivos celulares (Butenko *et al.*, 1993; Brouet y Ohshima, 1995; Calixto *et al.*, 2003; Chao *et al.*, 2007; Das y Das, 2007; Sun *et al.*, 2008; Androutsopoulos *et al.*, 2009).

I.4. Especies antiinflamatorias objeto de estudio

I.4.1. *Isodon xerophilus*

Isodon xerophilus (C.Y. Wu et H. W. Li) H. Hara, perteneciente a la familia Lamiaceae, es un arbusto perenne nativo de la provincia china de Yunnan que ha sido ampliamente usado como agente antitumoral, antiinflamatorio y antibacteriano por la población local (Li *et al.*, 2012). Esta especie fue estudiada por primera vez en el año 1999 por Hou y colaboradores, grupo que investigaba desde 1994 diterpenoides bioactivos pertenecientes a distintas especies del género *Isodon* (Hou *et al.*, 2000a). *I. xerophilus* representa una abundante fuente de compuestos terpenoides biológicamente activos; de este grupo, miembros diterpenoides *ent*-abietanos y *ent*-kauranos, y triterpenoides fueron aislados e identificados a partir de extractos de sus hojas. Las investigaciones farmacológicas se enfocaron en la evaluación citotóxica de los compuestos aislados sobre líneas celulares tumorales humanas a fin de avalar el uso tradicional de la planta como antitumoral (Hou *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b; McClatchey y Stevens, 2001; Li *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2015).

I.4.2. *Cayaponia tayuya*

Cayaponia tayuya Cogn. es una planta de la familia Cucurbitaceae, originaria de América del Sur, que crece en Río, Minas y otros estados de Brasil. Los pueblos originarios emplean sus raíces en el tratamiento de diversas afecciones: sífilis, lepra, dermatosis, amenorrea, epilepsia, edema, artritis y reumatismo, también para tratar diversas neuralgias y ciática, y se le atribuyen acciones como diurética, laxante, analgésica y antiinflamatoria. (Bauer *et al.*, 1985; Ríos *et al.*, 1990; Patel y Mishra, 2011; Freitas *et al.*, 2013; Tribess *et al.*, 2015). El primer estudio fitoquímico describe el aislamiento del aceite esencial obtenido a partir de raíces frescas e investigaciones posteriores revelan la presencia de flavonoides C-

heterosídicos y compuestos terpenoides: cucurbitacinas y sus heterósidos (Bauer y Wagner, 1983, Bauer *et al.*, 1985; Ríos *et al.*, 1990), cayaponósidos (glucósidos de *nor*-cucurbitacinas) y saponósidos, que justifican el intenso sabor amargo de las raíces y su capacidad de formar espuma cuando se las agitan en agua (Himeno *et al.*, 1992, Himeno *et al.*, 1993). Los ensayos guiados por bioactividad antiinflamatoria de los extractos de raíces y de las posteriores fracciones, confirmaron la presencia de C-glicosilflavonas y cucurbitacinas, y ambos grupos fitoquímicos mostraron actividad antiinflamatoria, justificando uno de sus usos en medicina tradicional y determinando los principios responsables de tal actividad (Ríos *et al.*, 1990). Las cucurbitacinas, en general, muestran actividad citotóxica (Himeno *et al.*, 1992); sus efectos farmacológicos son variados, los más importantes son fuerte actividad purgante, citotóxico y antitumoral, antiinflamatorio, hepatoprotector, anticonceptivo y estomacal (Miró, 1995; Yang *et al.*, 2007; Ríos, 2010; Recio *et al.*, 2012); otros estudios también han puesto en evidencia la capacidad de muchos cayaponósidos para actuar como inhibidores de la promoción tumoral (Konoshima *et al.*, 1995).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Inflamación

II.1.1. Descripción general de la respuesta inflamatoria

La respuesta adaptativa del cuerpo a cualquier tipo de estímulo nocivo es llamada inflamación y tiene como objetivo restaurar la homeostasis. Desde esta perspectiva pueden ser explicados tanto sus aspectos beneficiosos como perjudiciales. En general, el término es usado para describir varios procesos patológicos con diversas causas como infección, trauma o respuestas autoinmunes. Los eventos moleculares y celulares que están implicados en la respuesta inflamatoria aguda a la infección son los mejores comprendidos, en menor medida se conocen aquellos inducidos por lesión tisular y mucho menos aún se sabe sobre las causas y mecanismos de la inflamación crónica local y sistémica. En este último caso, un número creciente de enfermedades inflamatorias crónicas se han descrito donde la causa inicial no está bien definida, pero no involucra la infección o daño tisular. Estas condiciones inflamatorias son de particular interés debido a que acompañan a muchas enfermedades típicas de los países industrializados, incluidas obesidad y diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Medzhitov, 2010).

Entre inflamación aguda y crónica no hay una línea divisoria clara. La primera se refiere generalmente a una respuesta que comienza de manera abrupta y es de duración corta. La inflamación aguda es un evento bifásico en el cual la fase temprana está mediada por macrófagos residentes de tejidos y mastocitos, y conduce a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios como histamina, bradicinina, factor activador de plaquetas, prostaglandinas y leucotrienos (**Figura 1**). El efecto principal y más inmediato de los mediadores liberados en la fase temprana es provocar un exudado inflamatorio local: proteínas del plasma y leucocitos (principalmente neutrófilos) que normalmente están restringidos a los vasos sanguíneos ahora acceden, a través de las vénulas postcapilares, a los tejidos extravasculares en el sitio de infección o lesión, dando lugar a la fase tardía que corresponde a la etapa de infiltración y activación local de neutrófilos. Si la respuesta inflamatoria falla en eliminar al patógeno, el proceso inflamatorio persiste y adquiere nuevas características. Una inflamación aguda puede volverse crónica (en el sentido temporal) si el agente perjudicial es persistente. Por otro lado, la inflamación crónica está caracterizada por una proliferación de fibroblastos y formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), así como por un influjo

permanente de células inflamatorias, tales como granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, linfocitos y células plasmáticas. En ciertas condiciones inmunológicas, la inflamación crónica es primaria y no es precedida por una respuesta inflamatoria aguda (Zamora *et al.*, 2000; Medzhitov, 2008).

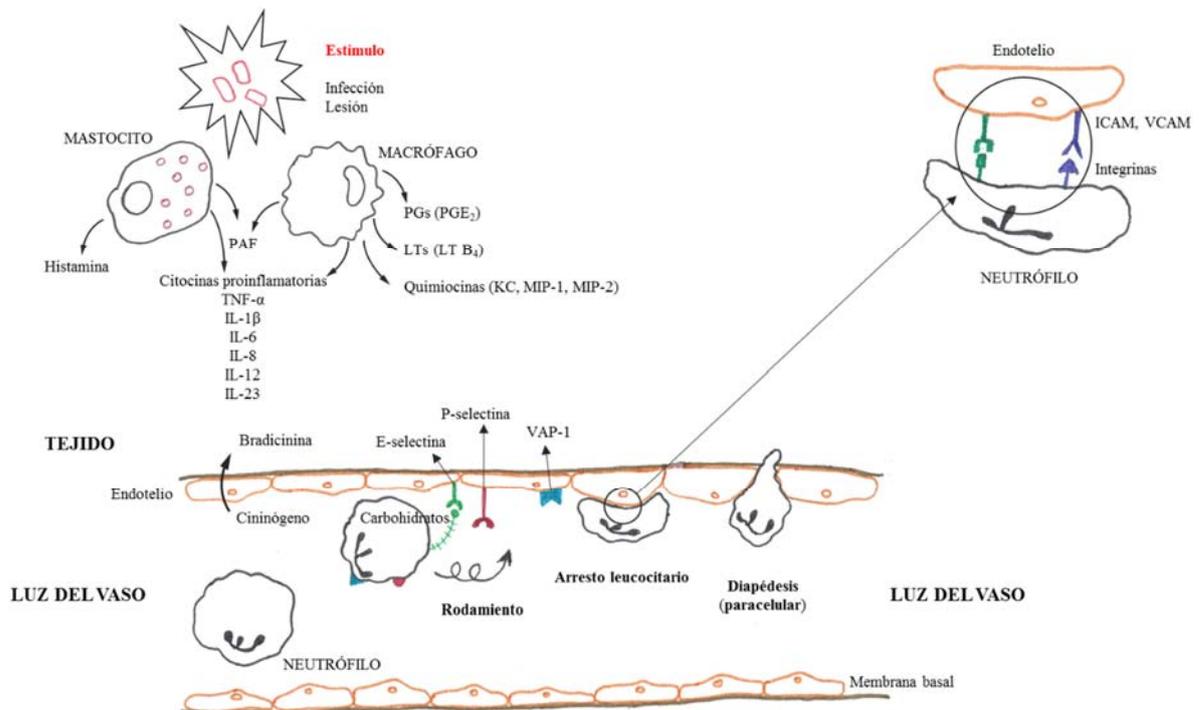


Figura 1. Fase temprana de la inflamación aguda.

La característica distintiva de la inflamación es la infiltración de neutrófilos (o eosinófilos, dependiendo de la naturaleza del estímulo) y posteriormente de monocitos en el sitio implicado. Su infiltración está principalmente gobernada por varias quimiocinas como MIP-1 (de *Macrophage Inflammatory Protein-1* en inglés), KC (de *Keratinocyte Chemoattractant* en inglés) y MCP-1 (de *Monocyte chemoattractant protein-1* en inglés). Esas quimiocinas son producidas por una variedad de células, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y células epiteliales, en respuesta a estímulos externos como bacterias y hongos, así como a estímulos endógenos como patrones moleculares asociados a daño, liberados de células muertas. La producción de quimiocinas está también sometida a regulación negativa o positiva por una variedad de productos, como NO y prostaglandinas (Rock y Kono, 2008; Kobayashi, 2010).

En el proceso de reclutamiento de leucocitos que ocurre durante la inflamación aguda, los neutrófilos son los primeros en salir de los vasos en número significativo y migrar al sitio de lesión en respuesta a KC y MIP-1 principalmente; más tarde los monocitos reemplazan a los neutrófilos, sugiriendo un patrón de reclutamiento bimodal en el cual los neutrófilos median el cambio por liberación de factores solubles que inducen MCP-1, iniciando el reclutamiento de los monocitos (Henderson *et al.*, 2003). El reclutamiento de leucocitos al sitio de lesión se lleva a cabo a través de varias etapas secuenciales de interacciones adhesivas (**Figura 1**). Se inicia con la formación de uniones transitorias de los leucocitos circulantes al endotelio de los vasos, que conduce a su rodamiento a lo largo de la superficie de la capa endotelial, donde el flujo sanguíneo es un parámetro crítico en la interacción leucocito - célula endotelial; posteriormente, si el granulocito recibe las señales de activación apropiadas, es capaz de formar uniones firmes que permiten su inmovilización, y finalmente ocurre la migración transendotelial de los leucocitos que se acumulan en el sitio de la inflamación (Tohka *et al.*, 2001; Mundhekar *et al.*, 2006; van Buul y Hordijk, 2009; Muller, 2009). Esta última etapa, también llamada diapédesis, ocurre por dos rutas: paracelular cuando el leucocito pasa a través de las uniones entre células endoteliales, y transcelular, a través del cuerpo de la célula endotelial; en la primera se inducen aperturas transitorias o aflojamiento de las uniones adherentes entre las células endoteliales que permiten a los leucocitos atravesar la capa endotelial. Por otra parte, en la migración transcelular, las uniones entre las células endoteliales permanecen intactas; en cambio, las membranas de la célula endotelial y del neutrófilo se fusionan y remodelan formando un canal a través del cual ocurre la migración. Posteriormente ocurren alteraciones de la membrana basal subendotelial que posibilita el acceso del neutrófilo a los tejidos periféricos (Kaplanski *et al.*, 1994; Muller, 2009).

Las interacciones iniciales de adhesión y rodamiento están mediadas por E y P-selectinas. Se expresan en la superficie endotelial y se unen a moléculas de carbohidratos de superficie presentes en los neutrófilos. También inducen un marcado redondeo de las células endoteliales facilitando las futuras interacciones más firmes (Kaplanski *et al.*, 1994).

VAP-1 (de *Vascular Adhesion Protein-1* en inglés) es una glicoproteína endotelial de superficie, con dos funciones bien conocidas: es una enzima con actividad monoamino oxidasa y una molécula de adhesión para los linfocitos, y resultados más recientes indican que cumple un importante papel en la etapa inicial de rodamiento y adhesión estable de granulocitos. Ejerce una función de freno molecular, disminuyendo la velocidad de rodamiento de forma continua, favoreciendo las futuras adhesiones estables al endotelio (Tohka *et al.*, 2001); y la actividad

catalítica de VAP-1 tiene función de señalización mediante la inducción de la transcripción y traducción de E y P-selectinas (Jalkanen *et al.*, 2007).

El rodamiento se detiene y se induce un arresto leucocitario a la superficie endotelial a través de la interacción estrecha entre moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 (de *Intercellular Adhesion Molecule-1* en inglés), ICAM-2 (de *Intercellular Adhesion Molecule-2* en inglés) y VCAM-1 (de *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* en inglés) expresadas en la superficie endotelial, con integrinas que se expresan en la superficie de los leucocitos activados, tales como CD11a (CD, en inglés *Cluster of Differentiation*) / α L β 2, α 4 β 1, α 4 β 7 α L β 2. Las moléculas de adhesión, además de la función adhesiva, tienen función de señalización que contribuye al desarrollo de la etapa posterior de diapédesis (Kaplanski *et al.*, 1994; Muller, 2009).

El mecanismo de migración transendotelial no es del todo comprendido. La migración transcelular parece ocurrir cuando la unión entre las células endoteliales es muy estrecha, como ocurre en la barrera hematoencefálica. La ruta paracelular es la más estudiada; en ella, la agrupación de ICAM-1 y VCAM-1 transmite señales hacia el interior de las células endoteliales que son relevantes para la diapédesis. Su entrecruzamiento estimula el aumento citosólico de iones de calcio libres lo cual conduce a la contracción de las fibras de actina y miosina que ayuda a la separación de las células endoteliales; además otras muchas moléculas están involucradas, entre ellas, JAM (de *Junctional Adhesion Molecule* en inglés), PECAM (de *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule* en inglés), VE-cadherina (de *Vascular Endothelial Cell Cadherin* en inglés) y Rap-1 (de *Ras proximity 1* en inglés) (Muller, 2009; Filippi, 2015).

En los espacios extravasculares, las proteínas del plasma depositadas mediante el exudado, forman una matriz provisional para la unión de las integrinas leucocitarias. Los neutrófilos, en el sitio de infección, fagocitan y destruyen al patógeno dentro del fagolisosoma (**Figura 2**). El mecanismo principal por el cual matan al agente fagocitado es la producción masiva de ROS (de *Reactive Oxygen Species* en inglés) que incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el ácido hipocloroso. Simultáneamente, se liberan proteínas antibacterianas tales como catepsinas, defensinas, lactoferrina y lisozima que participan junto con ROS de la destrucción del patógeno (Nathan, 2006; Boudiaf *et al.*, 2016). En respuesta a agonistas específicos los neutrófilos generan microvesículas que contienen MMPs (de *Matrix Metalloproteinase* en inglés), MPO (de *Myeloperoxidase* en inglés), proteinasas y elastasas; todas ellas, enzimas implicadas en el proceso de eliminación del

microorganismo. El repertorio de proteínas en las microvesículas varía dependiendo de las condiciones bajo las cuales fueron generadas (Naussef y Borregaard, 2014).

Luego de eliminar al patógeno existen una serie de rutas disponibles para remover a los neutrófilos, incluyendo la recirculación sistémica, el drenaje linfático, o la muerte por apoptosis o necrosis seguida de fagocitosis; la apoptosis seguida de fagocitosis se considera la más deseable para una resolución exitosa (Gilroy *et al.*, 2004). Mientras los neutrófilos se someten a apoptosis, los monocitos se diferencian a macrófagos y fagocitan a los neutrófilos apoptóticos sin causar respuestas inflamatorias, lo que contribuye a la resolución de la inflamación. Esto implica que las células apoptóticas tempranas inhiben la respuesta inflamatoria de los macrófagos, tal como la producción de citocinas proinflamatorias, en un proceso activo mediado por la producción de citocinas antiinflamatorias como TGF- β (de *Transforming Growth Factor- β* en inglés) e IL-10 (interleucina) y prostaglandina E₂ (mediador lipídico del cual se ha informado actividad anti y proinflamatoria) (Fadok *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 2006; Kobayashi, 2010).

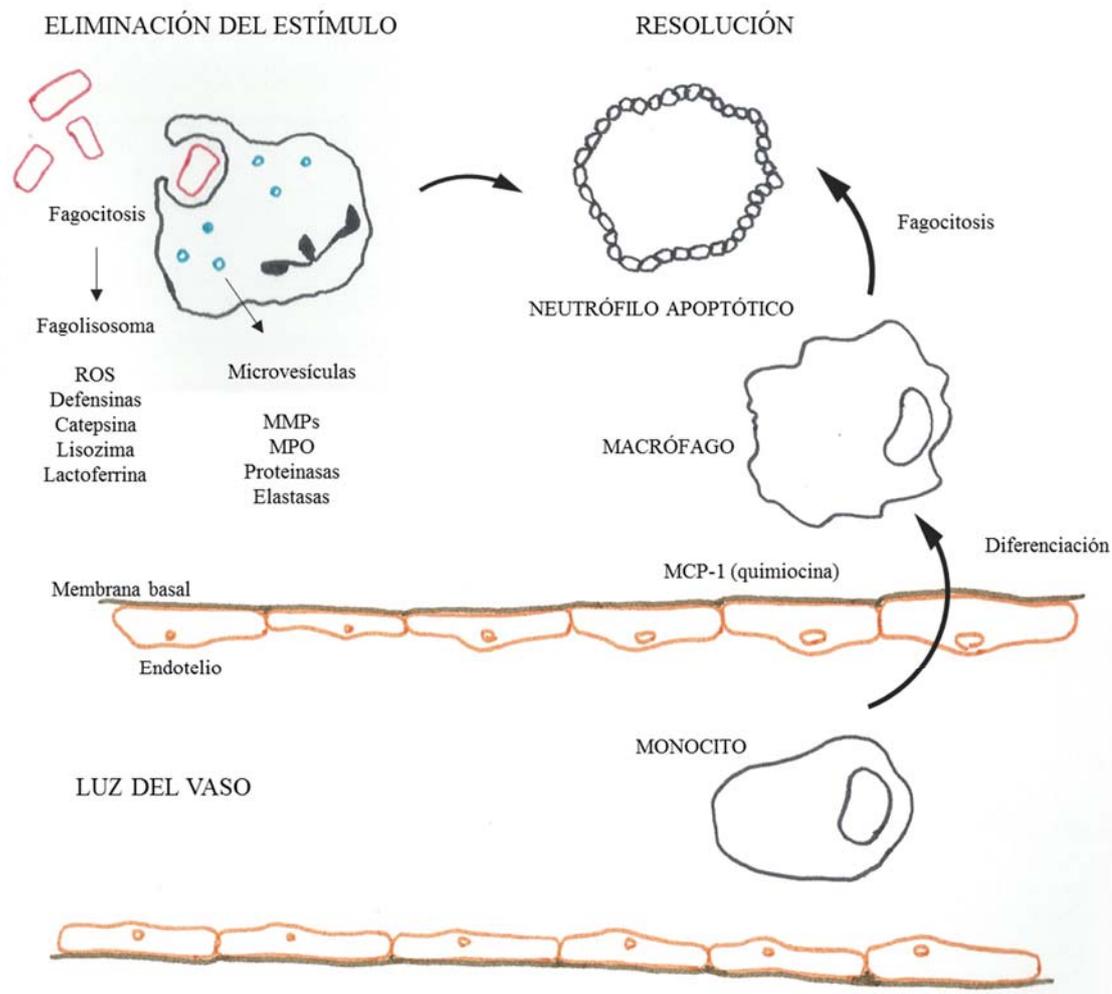


Figura 2. Etapa tardía de la inflamación aguda.

Una respuesta inflamatoria aguda exitosa resulta en la eliminación del agente infeccioso o material nocivo, seguida por una fase de resolución y reparación del tejido, y esa resolución no es simplemente una terminación pasiva de la inflamación, sino más bien un proceso bioquímico y metabólico activo (Chan y Moore, 2010; Fullerton *et al.*, 2013). El proceso de resolución se inicia rápidamente en el lugar por mecanismos celulares que sintetizan mediadores lipídicos duales: con actividad antiinflamatoria y proresolución, tales como lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas (Sheran *et al.*, 2015).

La resolución de la inflamación está mediada por un cambio activo en los mediadores que predominan en el sitio de inflamación, este cambio debe producirse para que ocurra la transición del estado inflamatorio a la homeostasis. Allí inicialmente, los neutrófilos confinados en el exudado, sintetizaron a partir de ácido araquidónico vía COX y 5-LOX, mediadores lipídicos tales como prostaglandinas y leucotrienos, que son ampliamente reconocidos por sus actividades proinflamatorias. A medida que avanza el proceso inflamatorio dejan de producir quimioattractantes (como leucotrieno B₄), y tanto prostaglandina E₂ como prostaglandina D₂, presentes en el exudado y actuando hasta entonces como mediadores proinflamatorios, promueven una modificación en la expresión enzimática de los neutrófilos que cambian su fenotipo a un fenotipo proresolución: vía 15-LOX y 5-LOX/12-LOX (ésta última presente en las plaquetas), sintetizan lipoxinas a partir del ácido araquidónico, y resolvinas y protectinas a partir de otros ácidos grasos; y los macrófagos de fenotipo M2 generan maresinas (**Figura 3**). Este nuevo conjunto de mediadores lipídicos pone fin al proceso inflamatorio y promueve la resolución (Sheran *et al.*, 2008, 2015).

Los efectos proresolución de las lipoxinas incluyen: la inhibición del tráfico de neutrófilos (o de eosinófilos); la estimulación del reclutamiento de monocitos y de la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos mediada por macrófagos derivados de monocitos; la modulación de la actividad metaloproteinasa estimulada por citocinas; y la inhibición de la proliferación celular (McMahon *et al.*, 2001; Gilroy *et al.*, 2004).

A diferencia de las lipoxinas, que son metabolitos del ácido araquidónico (un ácido graso omega-6), las resolvinas se forman por metabolización de ácidos grasos omega-3, principalmente EPA (de *Eicosapentaenoic Acid* en inglés) y DHA (de *Docosahexaenoic Acid* en inglés); y las protectinas a partir de DHA, presentando sus moléculas estructura de trieno conjugado. Colectivamente lipoxinas, resolvinas y protectinas representan una clase novedosa de agentes antiinflamatorios que están fuertemente asociados con la resolución de la

inflamación aguda (Gilroy *et al.*, 2004; Schwab y Serhan, 2006; Schwab *et al.*, 2007; Souza y Norling, 2016).

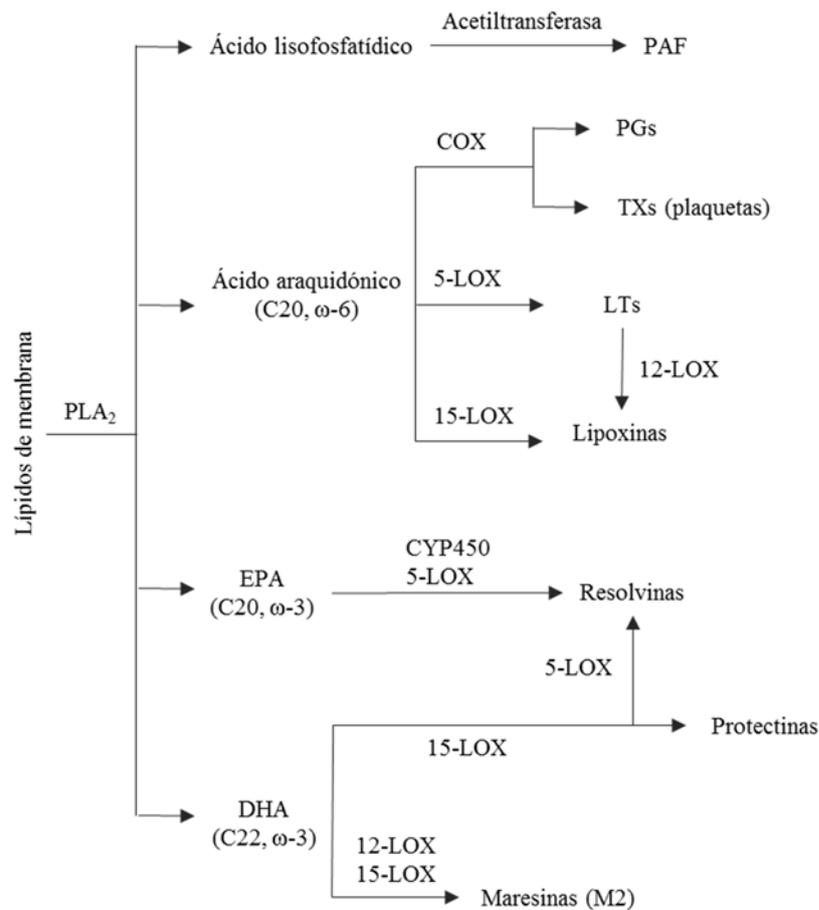


Figura 3. Derivados de lípidos de membrana. Mediadores proinflamatorios: PAF, PGs y LTs, y prorrresolución: lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas.

Un proceso inflamatorio, además está acompañado por signos clínicos conocidos como signos cardinales de la inflamación. Son el resultado macroscópico del número enorme de eventos celulares y moleculares, y se manifiestan como cambios progresivos. Los signos cardinales de la inflamación son enrojecimiento, calor, hinchamiento, dolor y alteración de la función. Los tres primeros son consecuencia directa de la alteración vascular: el enrojecimiento y el calor resultan por el incremento del flujo sanguíneo, el cual es el resultado de una vasodilatación local que primero involucra arteriolas y luego capilares y vénulas, y la hinchazón es el resultado de la alteración de la permeabilidad vascular, las células endoteliales se vuelven permeables permitiendo la exudación de fluidos, proteínas plasmáticas y leucocitos tal como se explicó más arriba. De los cinco signos cardinales, la alteración de la función es universal, es decir que acompaña a todos los procesos inflamatorios, ya que la perturbación del estado funcional del tejido ocurre a expensas de su normal funcionamiento; y los cuatro signos

restantes son típicos de la inflamación aguda que acompaña a infecciones y heridas (Zamora *et al.*, 2000; Medzhitov, 2010; Okin y Medzhitov, 2012).

II.1.2. La ruta inflamatoria

Como sugiere la descripción general, la respuesta inflamatoria consiste en una red de interacciones muy compleja. En ella, puede reconocerse una amplia gama de señales, clasificadas en categorías funcionales como inductores y mediadores. Los inductores inician la respuesta inflamatoria activando sensores especializados, los cuales desencadenan la producción de conjuntos específicos de mediadores. Los mediadores, a su vez, alteran los estados funcionales de tejidos y órganos (que son los efectores de la inflamación) de una manera que les permita adaptarse a las condiciones indicadas por el inductor particular (**Figura 4**). Por lo tanto, y a pesar de la complejidad, en una vía inflamatoria genérica se distinguen cuatro componentes que se ajustan a una configuración universal: inductores, sensores, mediadores y efectores; y cada componente determina el tipo de respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2010; Okin y Medzhitov, 2012; Prockop, 2013).

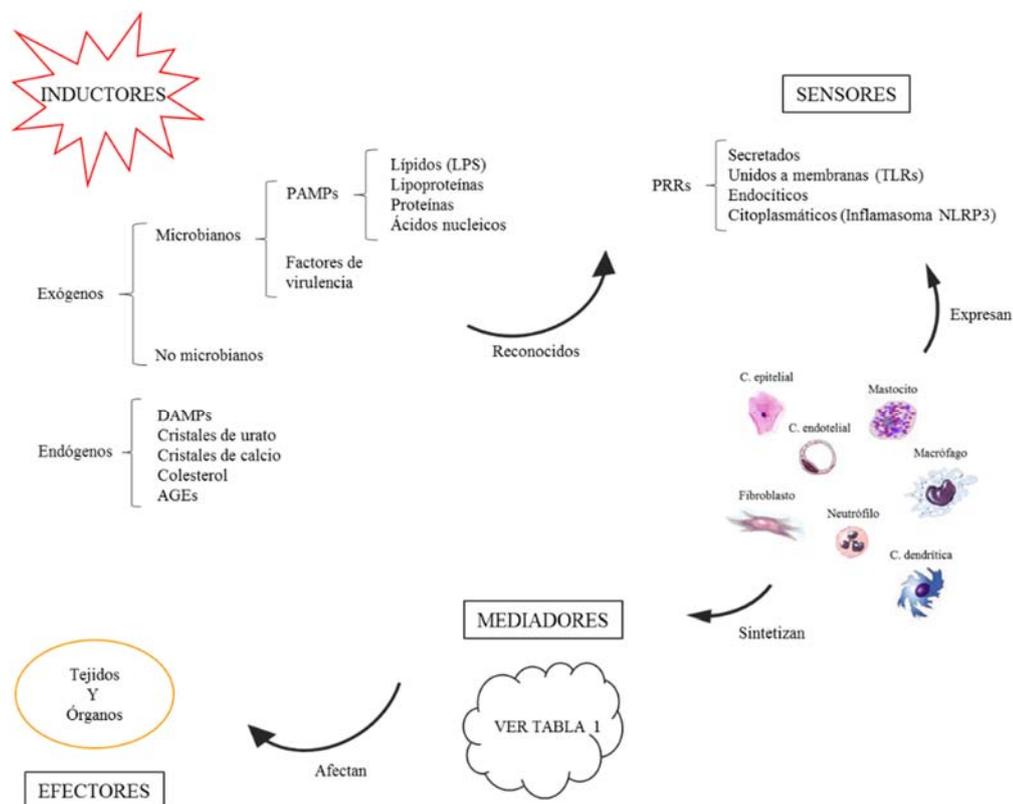


Figura 4. Componentes de la ruta inflamatoria.

II.1.2.1. Inductores y sensores

El primer criterio de clasificación de los inductores de la inflamación los diferencia en endógenos y exógenos, y estos últimos pueden ser de dos tipos: microbianos y no microbianos. Entre los inductores microbianos se reconocen dos clases diferentes: los llamados PAMPs (de *Pathogen-Associated Molecular Patterns* en inglés) y los factores de virulencia (Medzhitov, 2008).

Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

Los PAMPs son un conjunto limitado y definido de estructuras altamente conservadas, ya que son esenciales para la viabilidad de los microbios; se encuentran en amplios grupos de microorganismos sean patógenos o comensales. Están definidos en el sentido de que el huésped ha evolucionado un conjunto correspondiente de receptores conocidos como PRRs (de *Pattern-Recognition Receptors* en inglés) que detectan su presencia. Los PRRs pueden ser clasificados en cuatro tipos: secretados, unidos a membrana, endocíticos o fagocíticos, y citoplasmáticos, y son expresados por muchos tipos celulares incluyendo macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos, y células epiteliales (Gao *et al.*, 2008, Martinon *et al.*, 2009).

Los PRRs secretados son un grupo de proteínas solubles sintetizadas principalmente en hepatocitos y liberadas al torrente sanguíneo; incluyen colectinas, ficolinas y pentraxinas que se unen a las superficies celulares microbianas, activan las vías clásica y de lectina del sistema del complemento, y opsonizan patógenos para ser fagocitados por macrófagos y neutrófilos (Gao *et al.*, 2008; Iwasaki y Medzhitov, 2010; Berenbaum, 2013).

Los PRRs unidos a membrana son receptores de señalización, activan vías transduccionales induciendo la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, citocinas proinflamatorias como TNF- α (de *Tumor Necrosis Factor* en inglés), quimiocinas y moléculas coestimuladoras y de adhesión (Martinon *et al.*, 2009). Este grupo está constituido por los llamados TLRs (de *Toll-Like Receptors* en inglés); fueron descubiertos en 1990 y se identificaron entre diez y doce TLRs funcionales. Los miembros de la familia TLR son proteínas transmembranas con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina que media el reconocimiento de los PAMPs, un dominio transmembrana de anclaje, y un dominio citoplasmático homólogo al de los receptores de IL-1 requerido para la transducción de la señal. Los PAMPs reconocidos por TLRs incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas, y ácidos nucleicos derivados de una amplia gama de microbios tales como bacterias, virus, parásitos y hongos. La localización celular de TLRs incluye la membrana plasmática y organelas como endosomas y

lisosomas, y se piensa que la ubicación apropiada es importante para la accesibilidad del ligando y el mantenimiento de la tolerancia a moléculas propias (Kawai y Akira, 2010).

TLR4 es el principal receptor en la señalización por LPS (lipopolisacárido) y pone en marcha una vía de señalización que activa al factor de transcripción NF- κ B (**Figura 5**), induciendo la transcripción de genes que codifican citocinas proinflamatorias así como la maduración funcional de células presentadoras de antígeno del sistema inmune innato (Lu *et al.*, 2008; Kawai y Akira, 2010).

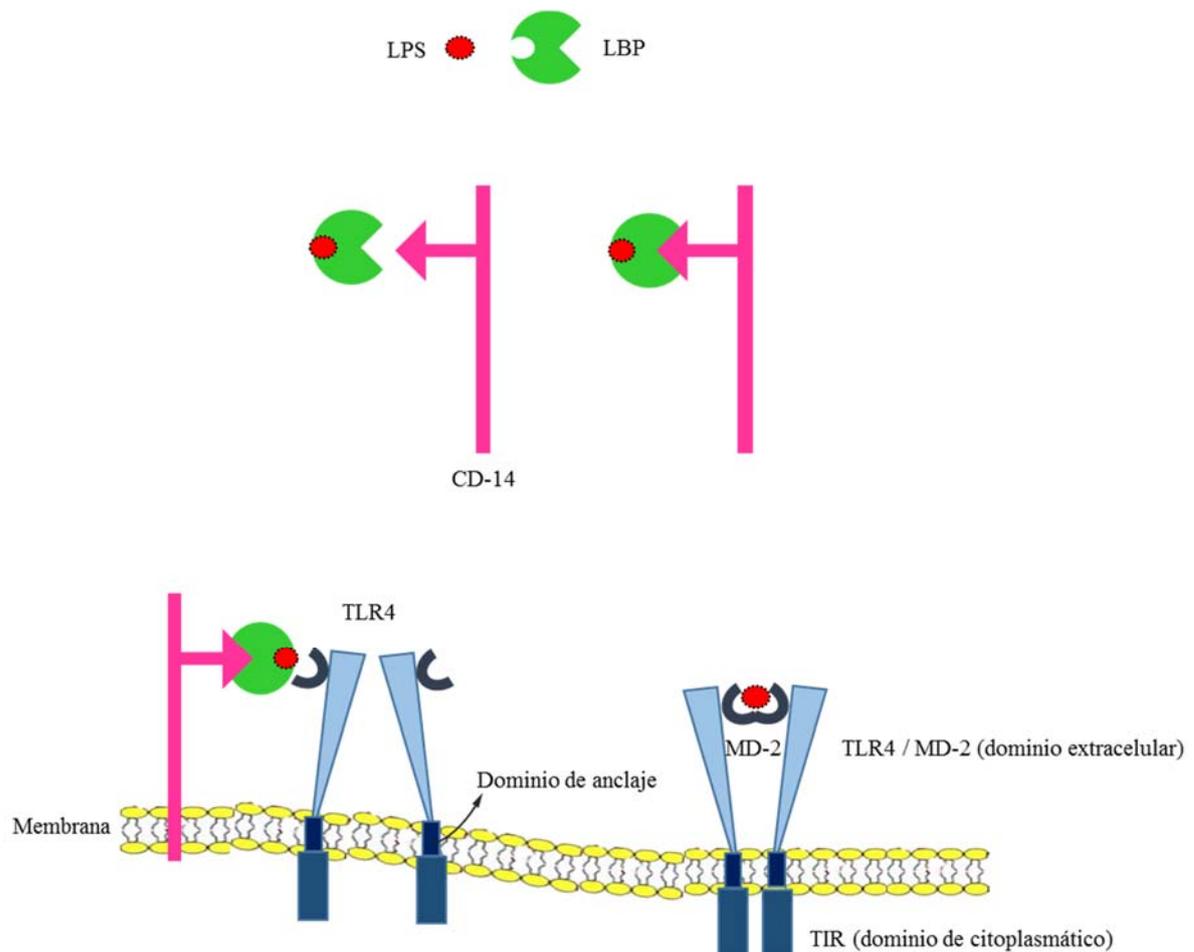


Figura 5. Activación de receptores TLR-4 por LPS.

El LPS es un potente inductor de respuestas proinflamatorias en monocitos, macrófagos y neutrófilos, uno de los componentes inmunoestimuladores mejor estudiados de bacterias que puede inducir inflamación sistémica y sepsis. El LPS es un componente estructural de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y consta de tres partes: el lípido A, un centro oligosacárido, y una cadena lateral O. El lípido A es el principal PAMP del LPS (Miller *et al.*, 2005).

Cuando el LPS es liberado de la pared celular bacteriana se acopla a la proteína soluble LBP (de *LPS Binding Protein* en inglés). LBP facilita la interacción entre LPS y CD-14, proteína identificada como el primer receptor de LPS al que se une con alta afinidad. CD-14 es una proteína anclada por glicosilfosfatidilinositol a la pared celular que también existe en forma soluble y facilita la transferencia del LPS al complejo receptor TLR4/MD-2 (Fan y Cook, 2004).

A partir del reconocimiento del LPS, TLR4 recluta proteínas adaptadores a través de interacciones con el dominio citoplasmático conocido como TIR (de *Toll-Interleukin-1 Receptor* en inglés) como muestra la **Figura 6**. Hay cinco proteínas adaptadoras: MyD88 (de *Myeloid Differentiation primary response gene 88* en inglés), TIRAP (de *TIR domain-containing Adaptor Protein*, también conocida como MAL, *MyD88-Adapter-Like* en inglés), TRIF (de *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* en inglés), TRAM (de *TRIF-Related Adaptor Molecule* en inglés), y SARM (de *Sterile α - and Armadillo- Motif- containing protein* en inglés) (Lu *et al.*, 2008; Carlsson *et al.*, 2016). TIRAP facilita la asociación entre MyD88 y el dominio citoplasmático de TLR4 para iniciar la ruta de señalización dependiente de MyD88 (Kagan y Medzhitov, 2006). TRAM y TRIF median la ruta de señalización independiente de MyD88 (Yamamoto *et al.*, 2003), mientras que SARM ha sido descrito como un regulador negativo del sistema inmune pero su mecanismo aún no es conocido (Carty *et al.*, 2013; Carlsson *et al.*, 2016). La ruta dependiente de MyD88 activa IRAKs (de *IL-1 Receptor-Associated Kinases* en inglés) / TRAF6 (de *TNF Receptor-Associated Factor 6* en inglés) y finalmente los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 e IRF-5 que inducen la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias. La ruta independiente de MyD88 activa los factores de transcripción AP-1, NF- κ B e IRF-3; éstos últimos dos, inducen la transcripción de genes de interferones tipo I que son importantes en las respuestas antivirales y antibacterianas (Fan y Cook, 2004; Lu *et al.*, 2008).

Además de los PAMPs que activan a los diferentes TLRs, en los últimos años se identificaron inductores endógenos que también son ligandos de TLRs, conocidos en general como DAMPs (de *Danger-Associated Molecular Patterns* en inglés), son moléculas liberadas por células lesionadas del huésped o producidas por células del huésped durante las respuestas inflamatorias o inmunes; incluyen entre otros a proteínas de shock térmico, el factor de transcripción HMGB1 (de *High Mobility Group B1* en inglés), péptidos mitocondriales que portan grupos N-formilos característicos de proteínas procariotas y fragmentos de ácido hialurónico (Nathan, 2002; Minnicozzi *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2012).

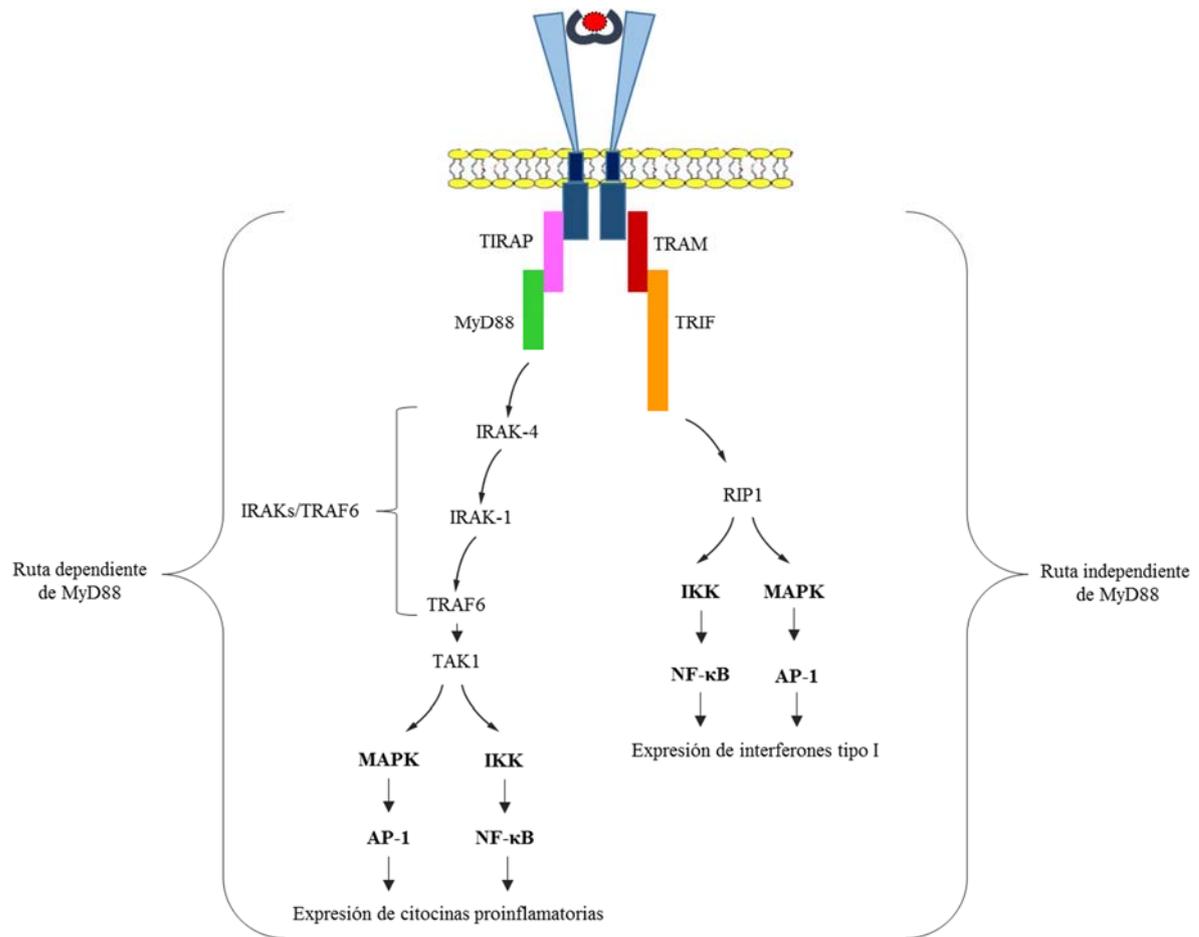


Figura 6. Transducción de la señal por receptores TLR4.

Los PRRs fagocíticos o endocíticos, también son PRRs unidos a membranas, se expresan en la superficie de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Pueden unirse directamente a patógenos que seguidamente son fagocitados en compartimentos lisosomales y destruidos. Incluyen receptores *scavenger*, receptores de manosa de macrófagos, y receptores de β -glucano (Gao *et al.*, 2008; Iwasaki y Medzhitov, 2010).

Los PRRs citoplasmáticos están constituidos por dos familias: RLHs (de *RIG-Like Helicases* en inglés) y NLRs (de *NOD-Like Receptors* en inglés). Estas familias consisten en proteínas solubles que inspeccionan el citoplasma en busca de signos que anuncien la presencia de invasores intracelulares. Los tres miembros de RLHs, son helicasas que detectan RNA (*Ribonucleic Acid* en inglés) viral. La familia de NLRs incluye unas veinte proteínas que forman parte de complejos citoplasmáticos denominados inflamomas (Martion *et al.*, 2009; Yoneyama y Fujita, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2013).

Factores de Virulencia

Los factores de virulencia se limitan a los organismos patógenos y no se detectan directamente como ocurre con los PAMPs. Es decir, los efectos adversos de su actividad en el tejido del huésped, son suficientes para desencadenar la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, el inflamasoma NLRP3 (o NALP3; de *NACHT, leucine-rich repeats and pyrin domain containing protein* en inglés) detecta el flujo de salida de iones potasio que resulta de la formación de poros producidos por exotoxinas de bacterias grampositivas (Medzhitov, 2008; Matsuda *et al.*, 2012).

Inductores Exógenos No Microbianos

Los inductores exógenos no microbianos incluyen alérgenos, irritantes, cuerpos extraños y compuestos tóxicos. Algunos alérgenos son detectados porque imitan la actividad virulenta de parásitos y otros pueden actuar como irritantes. La respuesta inflamatoria provocada por alérgenos se basa en la expulsión y remoción mediada por el epitelio de la mucosa (Tillie-Leblond *et al.*, 2005).

Los cuerpos extraños son partículas no digeribles que, o bien son demasiado grandes para ser fagocitadas o causan daños en la membrana fagosomal de los macrófagos. Las partículas de sílice y asbesto son ejemplos notorios de cuerpos extraños que provocan una respuesta inflamatoria. Su gran tamaño y resistencia a la eliminación, así como la falta de automarcadores (como CD47) que normalmente están presentes en las células autólogas y que evitan su fagocitosis (mediante la participación de receptores inhibitorios), apuntan a un hecho anormal en los tejidos. El reconocimiento de ausencia de “propio” presumiblemente desencadena un reflejo de fagocitosis en los macrófagos, pero el gran tamaño o la forma de las partículas extrañas resulta en una fagocitosis frustrada: es decir, se forma una taza fagocítica, pero no se puede cerrar para formar un fagosoma. Si un cuerpo extraño es demasiado grande para que se forme una taza fagocítica, el macrófago forma en su lugar un granuloma alrededor de este cuerpo: los intentos infructuosos de los macrófagos para engullir y destruir patógenos o cuerpos extraños pueden conducir a la formación de granulomas, en los que los intrusos son amurallados por capas de macrófagos, en un último intento de proteger al huésped. En algunos casos, los macrófagos pueden fusionarse entre sí para formar “células gigantes” que encapsulan al cuerpo extraño (Medzhitov, 2008).

Se encontró que el inflamasoma NALP3 está implicado en el reconocimiento de sílice y asbesto por macrófagos. Su estimulación resulta en una robusta secreción de IL-1 β donde la producción de ROS es requerida para la activación del inflamasoma (Cassel *et al.*, 2008).

Inductores Endógenos

Numerosos tipos de estímulos estériles que incluyen trauma mecánico, isquemia, estrés y radiación ultravioleta inician un estado de inflamación libre de patógenos denominada inflamación estéril. Los inductores de este tipo de inflamación son inductores endógenos, colectivamente llamados DAMPs y constituyen un grupo muy amplio y diverso de señales producidas por estos tejidos dañados que son reconocidos por TLRs y por el inflamasoma NLRP3 (Chen y Nuñez, 2010; Feldman *et al.*, 2015).

Un hecho común en la detección de la lesión tisular aguda es observar la liberación de componentes que normalmente se mantienen separados en las células y los tejidos intactos; alguno de ellos son ATP, iones potasio, ácido úrico y HMGB1. El secuestro o separación de estos componentes es producido por diversos tipos de compartimentación que se producen en los tejidos normales, mediante por ejemplo, la delimitación por membranas celulares, membranas basales, la superficie epitelial y el endotelio vascular. La ruptura de esta barrera se traduce en interacciones "no programadas". Estas interacciones indican la presencia de daño tisular y por lo tanto se inicia la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008).

Otras clases de inductores endógenos que no están involucrados en las respuestas inflamatorias agudas a la lesión tisular, son más relevantes para las enfermedades inflamatorias crónicas y para aquellas relacionadas con el envejecimiento. Esta clase de inductores incluye cristales de urato monosódico monohidratado y de pirofosfato cálcico dihidratado, AGEs (de *Advanced Glycation End Products* en inglés), lipoproteínas oxidadas (como las lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad) y depósitos de colesterol. En el caso de los cristales, cuando alcanzan cierto tamaño, son detectados por macrófagos y tratados esencialmente de la misma manera que los cuerpos extraños; los depósitos de cristales de urea y calcio provocan una inflamación aguda dolorosa después de su fagocitosis típica en enfermedades como gota y artritis (Ramesh *et al.*, 2007; So, 2008; Scivo *et al.*, 2011). Los AGEs son productos de glicación no enzimática de proteínas de larga vida, como el colágeno. Son reconocidos por su receptor RAGE (de *Receptor for Advanced Glycation End Products* en inglés) y están implicados en aterosclerosis, diabetes y enfermedades neurodegenerativas entre otras (Basta *et al.*, 2004; Ramasami *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008).

Otro grupo de inductores endógenos de inflamación consisten en productos de degradación de la ECM (de *Extracellular Matrix* en inglés) que son generados durante el mal funcionamiento o lesión del tejido. El componente mejor estudiado de la ECM en este contexto

es el hialuronato de glicosaminoglicano. En condiciones normales, el hialuronato está presente como un polímero de alto peso molecular inerte. La lesión tisular promueve su ruptura en fragmentos de bajo peso molecular, los cuales son inflamatorios, activando TLR4 y promoviendo una respuesta reparadora del tejido (Goldbach-Mansky, 2009; Henderson y Goldbach-Mansky, 2010).

La lista de los inductores endógenos de la inflamación es creciente, pero la literatura científica sobre este asunto contiene muchas discrepancias. Esto es debido en gran parte a las dificultades técnicas que están asociadas con la caracterización de esta clase de señales.

II.1.2.2. Mediadores y efectores

Los inductores de la inflamación provocan la producción de numerosos mediadores proinflamatorios, que a su vez alteran la funcionalidad de muchos tejidos y órganos, es decir, de los efectores de la vía inflamatoria. Pueden ser derivados de proteínas del plasma o ser secretados por células. Los mediadores proinflamatorios suelen clasificarse en siete grupos de acuerdo a sus propiedades bioquímicas: aminas y péptidos vasoactivos, fragmentos de componentes del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimioquinas y enzimas proteolíticas (**Tabla 1**). Algunos mediadores (como histamina y serotonina) están preformados y almacenados en los gránulos de mastocitos, basófilos y plaquetas, y otros están preformados y circulan como precursores inactivos en el plasma (Gilroy *et al.*, 2004; Medzhitov, 2008).

En primer lugar las aminas vasoactivas: histamina y serotonina (5-hidroxitriptamina) son compuestos de bajo peso molecular que surgen de manera “a todo o nada” cuando desgranulan las células que las producen. La histamina está contenida en gránulos de mastocitos y basófilos, mientras que las plaquetas son la fuente principal de serotonina. La liberación localizada de histamina resulta en formación de ronchas debido al aumento de la permeabilidad vascular. Induce la formación de aberturas reversibles en las uniones estrechas endoteliales, desencadena la formación de prostaciclina en el endotelio, e induce la liberación de NO del endotelio. La serotonina, cuando activa receptores en las células del músculo liso vascular, es responsable de la vasoconstricción, mientras que la interacción con los receptores endoteliales resulta en vasodilatación (a través de liberación de NO) y aumento de la permeabilidad. La liberación de histamina y serotonina de mastocitos y plaquetas puede ser provocada por reacciones de hipersensibilidad de tipo I mediada por inmunoglobulina E, directamente por C3a o C5a y por

proteínas catiónicas derivadas de gránulos de neutrófilos (Mannaioni *et al.*, 1997; Warren y Ward, 2001; Theoharides *et al.*, 2012, Greenlee-Wacker, 2014).

Tabla 1. Principales mediadores inflamatorios y sus categorías.

MEDIADORES PROINFLAMATORIOS						
AMINAS	PÉPTIDOS	FRAGMENTOS DEL COMPLEMENTO	MEDIADORES LIPÍDICOS	CITOCINAS	QUIMIOCINAS	ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
Histamina Serotonina	Bradicinina	C3a C4a C5a	PAF Eicosanoides	TNF- α IL-1 β IL-6 IL-8	RANTES MCP-1 MCP-2 KC MIP-1	Elastina Catepsinas Defensinas Lisozima Lactoferrina MMPs MPO

En segundo lugar, los péptidos vasoactivos se pueden almacenar como moléculas activas en vesículas secretoras, un ejemplo representativo es la sustancia P secretada por neuronas sensitivas y responsable de la sensación del dolor; o ser generados por proteólisis de precursores inactivos presentes en el fluido extracelular como por ejemplo, cininas, fibrinopéptido A, fibrinopéptido B y productos de degradación de fibrina que causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (Datar *et al.*, 2004; Omenetti *et al.*, 2012).

En tercer lugar, los fragmentos del complemento C3a, C4a y C5a (también conocido como anafilatoxinas) se producen por varias vías de activación del complemento. El fragmento C5a, y en menor medida C3a y C4a, promueven el reclutamiento de granulocitos (principalmente neutrófilos) y monocitos, e inducen el reclutamiento y desgranulación de mastocitos (Niculescu y Rus, 1999; Marshall, 2004; Mayadas *et al.*, 2013).

En cuarto lugar están los mediadores lipídicos: eicosanoides y PAF (de *Platelet-Activating Factor* en inglés); son derivados de fosfolípidos presentes en la cara interna de las membranas celulares (**Figura 3**). Después de la activación por iones Ca^{2+} intracelulares, la PLA₂ citosólica genera a partir de fosfatidilcolina, ácido araquidónico y ácido lisofosfatídico, los precursores de los mediadores lipídicos mencionados. El ácido araquidónico se metaboliza para formar eicosanoides vía COX, que genera prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, o vía LOX, generando leucotrienos. Todos estos compuestos son fundamentales para la regulación de la inmunidad y la inflamación. El PAF se genera mediante la acetilación del ácido

lisofosfatídico y es un potente mediador de la inflamación: causa activación de neutrófilos, incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, y activación de plaquetas (Zurier, 2014).

En quinto lugar, las citocinas proinflamatorias (TNF- α , interferón- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 y otras) son producidas principalmente por macrófagos y mastocitos. Tienen varios papeles en la respuesta inflamatoria, incluyendo la activación del endotelio y leucocitos, y la inducción de la respuesta de fase aguda (D'Elia *et al.*, 2013, DeBruin *et al.*, 2015).

En sexto lugar, las quimiocinas (RANTES o CCL5, MCP-1 o CCL2, MIP-1 α o CCL3, KC y otras) son una amplia variedad de citocinas quimiotácticas producidas por muchos tipos celulares; controlan la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados (Roy *et al.*, 2014).

En séptimo lugar, varias enzimas proteolíticas, incluyendo elastina, catepsinas y MMPs tienen diversas funciones en la inflamación. La mayoría de estas moléculas se almacenan en gránulos citoplasmáticos de neutrófilos que o bien destruyen al microorganismo una vez formado el fagolisosoma o son liberadas en el espacio extracelular. Estas proteasas tienen un papel importante en muchos procesos, incluyendo la defensa del huésped, la degradación de la ECM y de proteínas de la membrana basal y la migración de leucocitos (Wilgus *et al.*, 2013).

Cabe señalar que muchos mediadores no sólo tienen efectos directos en los tejidos diana, sino también ellos mismos inducen la producción de mediadores adicionales.

Finalmente, los efectores de una respuesta inflamatoria son los tejidos y células, cuyos estados funcionales se ven afectados específicamente por los mediadores de la inflamación. Aunque el efecto más obvio de los mediadores inflamatorios es inducir la formación de un exudado (a través de sus efectos sobre el tejido vascular y en la migración de leucocitos), muchos mediadores inflamatorios tienen otros efectos, igualmente importantes, en funciones neuroendocrinas y metabólicas y en el mantenimiento de la homeostasis del tejido en general (Medzhitov, 2008).

II.1.3. Inflamación crónica

Si la respuesta inflamatoria aguda no logra eliminar al inductor inflamatorio, la fase de resolución no puede desplegarse adecuadamente y sobreviene un estado inflamatorio crónico. Este estado puede ser causado por infecciones crónicas, alérgenos persistentes, partículas

extrañas no digeribles o cristales endógenos. En estos casos la respuesta inflamatoria crónica está localizada en el sitio donde está presente el inductor inflamatorio y resulta en diferentes tipos de remodelación del tejido local: por ejemplo, formación de granulomas y generación de órganos linfoides terciarios en el sitio de infección persistente, o remodelación del tejido epitelial respiratorio que resulta en asma en el caso de inflamación bronquial inducida por alérgenos persistentes (Toro Castaño, 2009; Medzhitov, 2010).

Las respuestas inflamatorias típicas operan durante desviaciones severas de la homeostasis, como las mencionadas con anterioridad: infección, lesión de tejidos y presencia de cuerpos extraños o irritantes. Sin embargo, estos inductores, están en el extremo final de un amplio espectro de condiciones que pueden desencadenar la inflamación, y desencadenan respuestas de la más alta magnitud, motivo por el cual son las respuestas inflamatorias más conocidas y caracterizadas (Medzhitov, 2008).

Por otro lado, se describe un número creciente de enfermedades inflamatorias crónicas en las que el inductor no está claramente definido, pero no involucra infección ni lesión tisular. Estas condiciones inflamatorias presentan particular interés debido a que acompañan a muchas enfermedades de países industrializados o aquellas asociadas a envejecimiento, aunque también padecidas por adultos jóvenes (Goto, 2008; Franceschi y Campisi, 2014). Enfermedad de hígado graso no alcohólico, obesidad, resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, están asociadas a estados proinflamatorios crónicos de bajo grado; y aunque los mecanismos de estos estados inflamatorios crónicos son prácticamente desconocidos, se observa un desequilibrio, una desregulación de varias citocinas, factores de transcripción y otros mediadores (de Jager *et al.*, 2006; Tilg y Moschen, 2008; Maitra *et al.*, 2012; Pawelec *et al.*, 2014).

Es decir, que una respuesta inflamatoria es puesta en marcha siempre que se detecten fallos en el funcionamiento de tejidos, pero su magnitud es variable; hay respuestas de intensidad de bajo grado y respuestas de intensidad de alto grado. Su propósito siempre es eliminar la fuente de perturbación, permitir al huésped adaptarse a las condiciones anormales transitorias y en última instancia, restaurar la funcionalidad y la homeostasis. Un estado de estrés moderado en el tejido, conocido como inflamación de bajo grado o parainflamación, es capaz de desencadenar la cascada inflamatoria. Sin embargo, esta respuesta se clasifica como intermedia entre la línea base de la homeostasis y la respuesta inflamatoria clásica contra infección o lesión. Estas respuestas inflamatorias de bajo grado de intensidad, se cree que juegan

un papel importante en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias crónicas y en la patogénesis de varias enfermedades humanas modernas (Ashley *et al.*, 2012) como se indicó antes.

Cuando las condiciones anormales se mantienen, entonces el estado inflamatorio en curso cambia el rango de valores homeostáticos a diferentes puntos de referencia. Este cambio adaptativo puede resultar en una mala adaptación, por ejemplo una disminución transitoria de la sensibilidad a insulina durante la inflamación aguda permitiría la redistribución de la glucosa a partir de uno de sus principales consumidores (el músculo esquelético) a leucocitos y otros tipos de células que podrían tener un aumento de la demanda de energía durante la infección y la reparación tisular; sin embargo, si la disminución de la sensibilidad a la insulina es sostenida puede conducir a diabetes de tipo 2. Los cambios adaptativos se producen a expensas de otros procesos fisiológicos y por lo tanto no pueden ser sostenidos sin efectos secundarios adversos, causados por la disminución en las funciones afectadas (Medzhitov, 2008).

El fenómeno de mala adaptación presenta consecuencias patológicas bien percibidas, pero una finalidad fisiológica desconocida. La causa de esta mala adaptación podría ser explicada por la falta de correspondencia entre el medio ambiente actual y las presiones evolutivas del pasado. Las enfermedades humanas antes mencionadas (obesidad, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis, asma y enfermedades neurodegenerativas) que se asocian con condiciones que no estaban presentes durante la evolución temprana de los humanos: disponibilidad continua de nutrientes ricos en calorías, bajo nivel de actividad física, exposición a compuestos tóxicos y vejez, están caracterizadas por inflamación crónica de baja magnitud, que podría no tener ninguna contraparte fisiológica (Gluckman y Hanson, 2004; Calle y Fernandez, 2010).

II.1.4. El macrófago

Históricamente los macrófagos se dividieron en dos categorías principales, los de fenotipo M1 y los de fenotipo M2, en función de su estado de activación: clásica o alternativa, y la actitud inflamatoria: proinflamatorios o antiinflamatorios; a pesar de que este paradigma se ha ampliado recientemente para dar cuenta de su enorme plasticidad funcional (Wang *et al.*, 2014).

En el 2000, Mills y colaboradores determinaron una diferencia metabólica relevante entre los subconjuntos M1 y M2, principalmente en el metabolismo de la arginina (Martinez y Gordon, 2014). Una vez diferenciados, los macrófagos M1 o clásicamente activados, muestran

una mayor capacidad de presentar antígenos, desencadenar la respuesta inmune Th1 y secretar altas cantidades de NO para matar patógenos intracelulares y ejercer citotoxicidad hacia células tumorales (Juhás *et al.*, 2015). Por otro lado, los macrófagos M2 expresan altos niveles de arginasa-I, que compite con iNOS (de *inducible Nitric Oxide Synthase* en inglés) por su sustrato común L-arginina, evitando así la generación de NO y produciendo poliaminas tróficas que favorecen la reparación de tejidos (Predonzani *et al.*, 2015).

Tras la activación proinflamatoria el macrófago M1, se caracteriza por la producción de NO a través de la expresión de iNOS (Juhás *et al.*, 2015); y las células fagocíticas, tales como polimorfonucleares, y en menor medida monocitos y macrófagos, por producir grandes cantidades de ROS, principalmente en la forma de superóxido y subsecuentes radicales, en un proceso conocido como "estallido respiratorio". Este aumento brusco en la concentración de superóxido, junto con el incremento concomitante en la producción de NO, conducen a la producción de numerosas RNS (de *Reactive Nitrogen Species* en inglés) que representan una respuesta rápida y temprana contra la invasión de patógenos, afectando su viabilidad debido a sus efectos microbicida y virucida. De este modo, como consecuencia del reclutamiento de células inmunes, se producen ROS y RNS para eliminar al agente nocivo y además para estimular la producción de mediadores de la inflamación, comportándose como segundos mensajeros con el fin de construir y coordinar la reacción inflamatoria (Izzi *et al.*, 2012).

De este modo, el macrófago clásicamente activado es una de las células efectoras más importantes en la respuesta inflamatoria. Además de generar altos niveles de NO, produce ROS, y secreta citocinas proinflamatorias incluidas IL-12, IL-23, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Zamora *et al.*, 2000; Allegra *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Sin embargo, esta respuesta debe ser controlada ya que la producción sostenida de altos niveles de NO y su reacción con ROS también pueden mediar un amplio espectro de efectos patológicos (Predonzani *et al.*, 2015).

Cualquier célula puede estar en uno de los cuatro estados posibles: basal, estresado, apoptótico o necrótico. Una célula está en un estado basal cuando las condiciones son normales, y este estado es mantenido por la disponibilidad de nutrientes, de factores de crecimiento y de oxígeno, y por unión a otras células y/o a la ECM. Un cambio en cualquiera de los parámetros ambientales internos vitales induce una respuesta de estrés, que es en esencia una adaptación celular a la condición anormal. Si el cambio en un parámetro es mayor que lo que la respuesta al estrés puede manejar, la célula experimenta apoptosis; si el cambio es aún mayor, la célula

sufre necrosis. Cada uno de los cuatro estados celulares está regulado por vías de señalización especializadas que están conectadas de modo que inhiben la transición al siguiente estado. Así, el estado celular más deseable inhibe la transición al estado siguiente, menos deseable, hasta que la transición es inevitable. La transición se produce de manera “a todo o nada”, esto permite a las células agotar los intentos por permanecer en un estado más preferible antes de hacer la transición al estado siguiente, menos preferible (Medzhitov, 2008).

Los macrófagos residentes del tejido principalmente, monitorean el estado de células y tejidos. Las denominaciones M1 y M2 se refieren a los dos extremos de un espectro posible de formas de activación de los macrófagos, que dependen de las señales que reciben del ambiente. Cuando los tejidos están en condiciones de estrés o mal funcionamiento, envían a los macrófagos un conjunto diferente de señales al enviado en estado basal. Los macrófagos, a su vez, producen conjuntos diferentes de señales que son relevantes para el tejido en particular. El objetivo principal de estas interacciones es ayudar a que los tejidos se adapten a condiciones estresantes y restauren su funcionalidad (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004).

Si el mal funcionamiento del tejido o el estrés son excesivos y la adaptación ya no es posible, las células mueren por apoptosis o necrosis. De nuevo, la muerte celular es controlada e interpretada por macrófagos. Además de la eliminación de las células apoptóticas o necróticas, los macrófagos toman una de las varias decisiones posibles, que van desde la remoción silenciosa de células muertas a la inducción de una respuesta inflamatoria. Debido a que la muerte celular necrótica se asocia por lo general con daño tisular, el resultado de reconocimiento de células necróticas por los macrófagos es generalmente una respuesta inflamatoria. La apoptosis, por el contrario, puede ocurrir por varias razones, y los macrófagos por lo tanto necesitan ser capaces de descifrar la causa de la muerte para desplegar las acciones apropiadas. De esta manera, para cada una de las situaciones en las que se produce apoptosis, es posible un resultado diferente (Rock y Kono, 2008; Wanikiat *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo de la apoptosis programada, las células muertas son eliminadas sin consecuencias adicionales; el reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos, da lugar a la inducción de vías antiinflamatorias e inmunosupresoras. Debido a que esta forma de apoptosis es una parte normal del desarrollo o renovación celular, ninguna acción adicional es necesaria (aunque en el caso de renovación celular, los macrófagos pueden producir factores de crecimiento que promuevan la proliferación celular, con el fin de reemplazar las células muertas). Si la apoptosis fue inducida por exceso de estrés o lesión ocasiona una pérdida de células no programada, que debe ser compensada por la generación de nuevas células del mismo

tipo. Por lo tanto, tras el reconocimiento de células que han muerto prematuramente, los macrófagos deben inducir una respuesta de reparación de tejido. En el caso de apoptosis inducida por infección, los macrófagos cambian a un modo de defensa del huésped, promoviendo así la generación de una respuesta inmune. Los macrófagos reconocen todas las células apoptóticas (independientemente de cómo se induce la apoptosis) y necróticas mediante la detección de fosfatidilserina en la superficie de estas células. El resultado hacia las diversas formas de muerte está probablemente determinada, por las señales adicionales, que son producidas diferencialmente por las células muertas por causas distintas (Ravichandran y Lorenz, 2007).

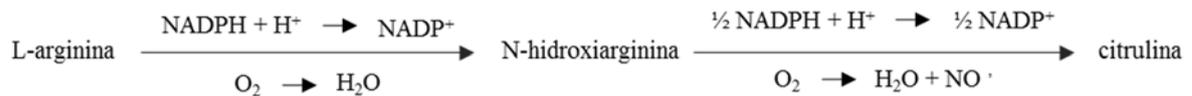
II.2. Óxido nítrico sintasa y óxido nítrico

En su papel fisiológico, el NO producido por células endoteliales vasculares, mediante una de las isoformas constitutivas de la NOS, eNOS (de *endothelial Nitric Oxide Synthase* en inglés), es un potente vasodilatador, y es un modulador clave del tono vascular. La producción de NO en células endoteliales activa la guanilato ciclasa soluble, resultando en la síntesis de cGMP (de *cyclic Guanosine Monophosphate* en inglés), el cual conduce a la relajación de las células del músculo liso vascular. El NO también modula la permeabilidad y la integridad del endotelio vascular y es un potente inhibidor de la adhesión de leucocitos en el sistema microvascular (Whittle, 2003).

Sin embargo, hace más de tres décadas que la producción de óxidos de nitrógeno fue asociada con inflamación. En 1981 ya se sabía que en humanos con fiebre y diarrea hay un marcado aumento en la excreción urinaria de nitratos. Se creyó entonces que la formación de nitrato era el resultado del metabolismo microbiano, pero nuevas observaciones sugirieron que los mamíferos también forman óxidos de nitrógeno y que podía existir una correlación entre inmunoestimulación y síntesis de nitrato (Wagner *et al.*, 1983). En 1985 se demostró por primera vez en células de mamífero *in vitro*, la producción de nitritos y compuestos que generan nitratos en macrófagos de ratón. Desde ese momento, la producción de NO se ha considerado de importancia primaria en los mecanismos antimicrobianos del huésped (Stuehr y Marletta, 1985).

La importancia del campo de investigación sobre el NO fue reconocida en 1998 con el otorgamiento del Premio Nobel a Furchgott, Ignarro y Murad por el trabajo que llevó al descubrimiento del NO como mediador biológico producido por las células de mamíferos. La

ruta metabólica conocida como ruta L-arginina: NO es la principal fuente de producción de NO en células de mamíferos. Su síntesis está cuidadosamente regulada bajo el control de diferentes NOSs específicas de tejido, que catalizan la conversión de L-arginina a citrulina y producen NO de acuerdo a la siguiente reacción química (Alderton *et al.*, 2001):



El NO es un radical libre (NO^\cdot), su propiedad radical se debe a la presencia de un electrón desapareado en el orbital antienlazantes $2p^*_y$. Es altamente lábil, su vida media es muy corta, se limita a unos pocos segundos en soluciones acuosas, pero aumenta su estabilidad en gran medida bajo condiciones de baja tensión de oxígeno. Además, el NO es soluble en disoluciones acuosas y lipídicas, de modo que puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares y el citosol, y reaccionar bajo condiciones diferentes, con oxígeno molecular y ROS, generando diferentes compuestos radicales y no radicales. Así, en el espacio extracelular, se descompone rápidamente a moléculas no radicales como nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) a través de la reacción con oxígeno y agua. A pesar de que estos productos han sido considerados clásicamente como productos finales relativamente inertes del metabolismo del NO, hallazgos recientes han informado de la existencia de una vía "nitrato-nitrito-óxido nítrico", que reduce estas moléculas de vuelta a óxido nítrico, que posteriormente puede volver a entrar en la célula. También, como para el oxígeno, el metabolismo del nitrógeno es capaz de producir especies radicales, las llamadas RNS. El destino más importante del NO reside dentro de las células, donde puede reaccionar fácilmente con ROS, entre ellos el anión superóxido para formar peroxinitrito (ONOO^-), un oxidante más potente. Esta especie altamente citotóxica, pueden oxidar una serie de especies moleculares claves que incluyen ascorbato, sulfidrilo y tioles, así como producir la oxidación de lípidos de membrana y causar fragmentación del DNA (*Deoxyribonucleic Acid* en inglés). Por lo tanto, un número amplio de radicales citotóxicos, que representan la mayor parte de la toxicidad del NO, pueden ser potencialmente generados a partir de NO en el medioambiente inflamatorio, donde las ROS se producen simultáneamente tanto por células inflamatorias como por el tejido afectado (Whittle, 2003; Izzi *et al.*, 2012).

Por otro lado, como era de esperar de una molécula pleiotrópica, en la literatura hay informes contradictorios respecto al rol del NO como agente anti o proinflamatorio. Las inconsistencias informadas probablemente se deban a las múltiples acciones celulares de esta molécula, al nivel y al sitio de producción, al medio redox en el cual es liberada y a los diferentes modelos de inflamación utilizados. El papel dicotómico del NO en inflamación, a menudo referido como la paradoja del NO, se basa principalmente en los datos contradictorios que muestran los efectos de inhibidores de la iNOS de selectividad variable en diferentes modelos animales. Ahora está claro que el NO no puede ser catalogado como una molécula anti o proinflamatoria, pero puede ser considerado como un verdadero mediador de la inflamación (Zamora *et al.*, 2000).

De este modo, el papel de la iNOS es controversial; al ser expresada en muchos tipos celulares, la fuente celular del NO y el microambiente en el que se produce, dicta su actividad biológica o patológica (Poon *et al.*, 2003; Kobayashi, 2010).

Hay tres isoformas de NOS, las ya mencionadas iNOS y eNOS, y la nNOS (de *neuronal Nitric Oxide Synthase* en inglés). Las células endoteliales y las neuronas expresan respectivamente eNOS y nNOS de forma constitutiva, y producen bajos niveles de NO bajo el control fisiológico del sistema Ca^{2+} /calmodulina. Por otro lado, la principal enzima responsable del papel que juega el NO en procesos inflamatorios es la iNOS, la cual no se expresa normalmente en células en reposo y debe ser inducida por estímulos inflamatorios e inmunológicos (Nathan y Xie, 1994; MacMicking *et al.*, 1997). La calmodulina es necesaria para la actividad de todas estas enzimas, mientras que la dependencia con la concentración de Ca^{2+} intracelular distingue las isoformas de NOS, donde nNOS y eNOS tienen un requerimiento mucho más alto de Ca^{2+} intracelular que iNOS. Aunque las tres isoformas de NOS están involucradas en mayor o menor medida en el curso de la inflamación, dada la enorme diferencia en la cantidad de NO producido por iNOS, su papel parece ser dominante en este proceso, mientras que nNOS y eNOS resultan críticas para una actividad fisiológica normal. Una cuarta enzima se ha caracterizado más recientemente en hígado de rata, la mtNOS (de *mitochondrial Nitric Oxide Synthase* en inglés); es constitutiva, dependiente de calcio y responsable de la homeostasis y la bioenergética mitocondrial. La activación de mtNOS bajo la administración de fármacos quimioterápicos induce estrés oxidativo y nitrativo, con la consecuente apoptosis celular (Boveris *et al.*, 2002; Lacza *et al.*, 2009; Kobayashi, 2010; Predonzani *et al.*, 2015).

En humanos, iNOS se expresa en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas de las vías aéreas, los vasos, los intestinos, los riñones, el corazón, la piel, indicando enfáticamente

que el NO juega un papel importante en la protección directa contra patógenos y en la patogénesis de la inflamación crónica. La producción de altos niveles de NO media un número de enfermedades inflamatorias e infecciosas, actuando tanto como un efector directo como un regulador de otras rutas efectoras (Zamora *et al.*, 2000).

La lista de tipos celulares capaces de expresar iNOS incluye macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, epitelio respiratorio, epitelio pigmentario de la retina, epitelio tubular renal, mioepitelio, adenocarcinomas, hepatocitos, células de los islotes del páncreas, endotelio, endocardio, células mesangiales, miocito cardíaco, músculo liso vascular, músculo liso del útero y trompas de Falopio, fibroblastos, condrocitos, osteoclastos, neuronas, y astrocitos. Sin embargo, los macrófagos de ratón son las células para las cuales la inducción transcripcional de iNOS ha sido formalmente documentada de manera más profusa, siendo el interferón- γ y el LPS los inductores más ampliamente utilizados (Nathan y Xie, 1994; Knowles y Moncada, 1994; Scott *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). También más recientemente, surgieron informes sobre la producción de NO en macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1, como resultado del aumento de la expresión del RNAm y de la actividad de iNOS (Woo *et al.*, 2005).

II.3. Ciclooxygenasa y prostaglandinas

En las células humanas hay al menos dos isoenzimas COX diferentes designadas COX-1 y COX-2, y sus actividades catalíticas básicas son lo suficientemente similares para tratarlas como si fueran bioquímicamente idénticas (Smith *et al.*, 2000).

La enzima COX o prostaglandina H sintasa, es una enzima homodimérica bifuncional unida a membrana que cataliza los dos primeros pasos: ciclooxygenación y peroxidación, comprometidos en la vía que conduce a la formación de prostaglandinas y tromboxanos. El ácido araquidónico, producido por la acción de fosfolipasas sobre fosfolípidos de la membrana celular, es el principal sustrato para la COX (**Figura 7**). En el primer paso de ciclooxygenación la enzima cicla y añade dos moléculas de O₂ al ácido araquidónico para formar prostaglandina G₂, y posteriormente mediante la actividad peroxidasa, cataliza la reducción de prostaglandina G₂ a prostaglandina H₂ (Morteau, 2000).

El sitio activo ciclooxygenasa une ácido araquidónico y también otros ácidos grasos como sustratos. Aunque COX-1 y COX-2 oxigenan al ácido araquidónico con una cinética casi idéntica, en general, COX-2 es mucho más eficiente con sustratos alternativos; por ejemplo, además de ácidos grasos, utiliza endocannabinoides (Kozak *et al.*, 2004).

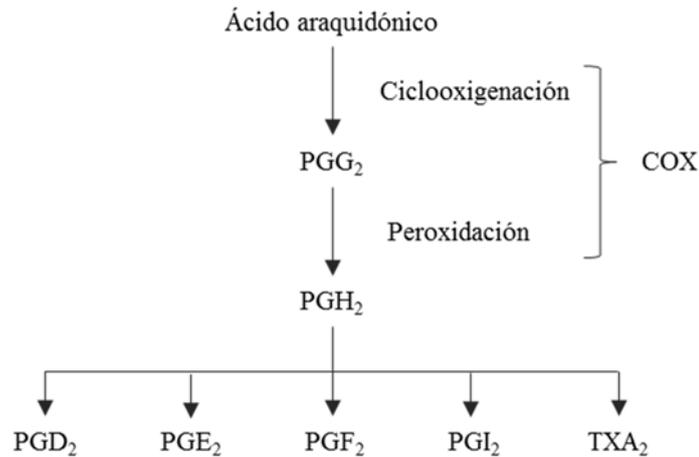


Figura 7. Papel de la COX en la producción de prostaglandinas.

Como ya se ha mencionado, las dos isoformas de COX catalizan reacciones idénticas y exhiben las mismas constantes cinéticas para la conversión del ácido araquidónico en prostanoïdes. Sin embargo, las distinciones más notables entre ellas son la regulación diferencial de su expresión y su distribución en el tejido. COX-1 es ubicua, su expresión es constitutiva en la mayoría de los tejidos, tales como aquellos que forman el sistema gastrointestinal, los riñones, el músculo liso vascular y las plaquetas. Al contrario, COX-2 es solamente constitutiva en partes del riñón y del cerebro, en membranas fetales y en el útero durante la pregnancy, en células endoteliales, células del músculo liso, osteoblastos, células mesangiales y sinoviocitos reumatoides. En todos los otros tejidos y células, COX-2 no es detectable, pero su expresión puede ser inducida por una gran variedad de mitógenos, promotores tumorales y estímulos proinflamatorios, incluyendo factores bacterianos y citocinas. En ensayos *in vitro*, la expresión de COX-2 en fibroblastos humanos y murinos puede ser inducida por TPA (de *12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate* en inglés), suero, IL-1 β , TNF- α , factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento derivado de plaquetas; y en macrófagos humanos y murinos, por LPS, IFN- γ e IL-1 β (Morteau, 2000).

En base a estas diferencias, se alude a COX-1 como la isoforma constitutiva de COX, mientras que a COX-2 como la isoforma inducible. No obstante, esta distinción no es del todo exacta, ya que COX-1 puede ser inducida bajo ciertas condiciones, y como se ha mencionado COX-2 se expresa constitutivamente en órganos, tales como riñón, tracto gastrointestinal, cerebro y timo (Kirkby *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha demostrado la existencia de

una tercera isoforma de COX que es especialmente sensible a paracetamol y compuestos relacionados. Esta nueva COX, denominada COX-3, es una variante de COX-1 y en humanos es más abundante en corteza cerebral y corazón (Botting, 2003; Botting y Ayoub, 2005).

En función de la regulación diferencial en la expresión de la COX, inicialmente se atribuyeron roles opuestos a las dos isoformas: inflamación para COX-2 y regulación homeostática para COX-1. Esto implica la existencia de dos conjuntos distintos de prostaglandinas con acciones opuestas, dependiendo de su origen celular y de la naturaleza del órgano diana. Las prostaglandinas derivadas de COX-1 median la acción citoprotectora en la mucosa gastrointestinal, la integridad de la función de plaquetas y la regulación de la homeostasis renal. Mientras que la COX-2, induce, es la isoforma responsable de la síntesis de prostaglandinas que participan en la respuesta inflamatoria (Lee *et al.*, 2005; Shaveta *et al.*, 2014; Rumzhum y Ammit, 2016).

COX-2 además, se expresa constitutivamente en muchas formas de cáncer incluyendo cáncer de mama, colon y próstata. Una serie de estudios demostró que esta enzima se expresa de manera estable desde las primeras etapas pre-neoplásicas; lo cual, anima a muchos investigadores a considerar a COX-2 también como un blanco potencial en quimiopreención y en el tratamiento del cáncer (Orlikova *et al.*, 2014).

El descubrimiento de las prostaglandinas data de 1930, cuando Goldblatt y Von Euler independientemente, hallaron un ácido graso en el fluido seminal humano con potentes propiedades vasoactivas. El compuesto fue llamado prostaglandina porque se asumió que se originaba en la glándula prostática (hoy se sabe que se origina en las vesículas seminales). Treinta años más tarde, fue establecida la estructura de las primeras dos prostaglandinas, que fueron llamadas prostaglandina E y prostaglandina F debido a sus respectivas particiones entre éter y tampón fosfato. Actualmente la nomenclatura de las prostaglandinas se describe en diez grupos designados con letras: desde la A hasta la J, según el grupo funcional unido en las posiciones 9 y 11 del anillo ciclopentano presente en sus estructuras. Cada grupo de prostaglandinas consiste en tres series designadas con los subíndices 1, 2 y 3, dependiendo del sustrato que las origina: ácido di-homo- γ -linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, respectivamente. Entre las prostaglandinas, las más ampliamente distribuidas y mejor caracterizadas son las de la serie 2, es decir aquellas derivadas del ácido araquidónico (PGE₂, PGD₂, PGI₂, y PGF_{2 α}). Para la prostaglandina F, el subíndice adicional α o β denota la configuración espacial del grupo hidroxilo en el carbono 9 (Clària y Romano, 2005).

La prostaglandina H₂, producto de la actividad de COX sobre el ácido araquidónico, es un endoperóxido altamente inestable, precursor de la biosíntesis de prostaglandinas de la serie 2 (D₂, E₂, F₂, I₂ o prostaciclina, y tromboxano A₂), siendo el sustrato intermedio de sintasas e isomerasas específicas de células. Curiosamente, el acoplamiento entre la síntesis de prostaglandina H₂ con su transformación a prostaglandinas y tromboxanos por las enzimas subsiguientes, está intrincadamente orquestado de una manera celular específica. Es decir, cualquier célula dada formadora de prostanoides, tiende a formar sólo uno de estos compuestos como su principal producto; sin embargo, prostaglandina E₂ se produce en muchos tipos celulares vía tres formas de la enzima prostaglandina E sintasa: cPGES (de *cytosolic Prostaglandin E Synthase* en inglés), mPGES-1 y mPGES-2 (m de *microsomal* o *membrane associated* en inglés). Mientras que cPGES es constitutiva, la expresión de mPGES-1 es inducida por LPS y citocinas proinflamatorias como IL-1β; de modo que durante la respuesta inflamatoria ocurre la inducción coordinada de múltiples enzimas de la vía de prostanoides, entre ellas COX-2 y mPGES-1 (Clària, 2003; Nicolaou, 2013; Stratz *et al.*, 2014).

Las prostaglandinas están implicadas prácticamente en todas las funciones vitales, incluyendo la gastrointestinal y cardiovascular, en los sistemas nervioso central y periférico, en el sistema renal y órganos reproductivos, mostrando una sorprendente variedad de efectos fisiológicos (Martinez Gonzalez y Badimon, 2007). Sin embargo, la acción más importante y mejor caracterizada es su papel en condiciones inflamatorias. Por ejemplo, en enfermedades como artritis, se observa una producción muy elevada de prostaglandina E₂ que resulta en destrucción tisular y dolor; en osteoartritis la prostaglandina E₂ ha sido implicada en la señalización del dolor, la erosión del cartílago, y la inflamación asociada; en inflamaciones de la piel como dermatitis atópica, la prostaglandina D₂ es el principal prostanoides involucrado; y en asma también prostaglandina D₂ media broncoconstricción (Balzar *et al.*, 2011; Nicolaou, 2013; Wang *et al.*, 2013c; Stratz *et al.*, 2014).

Además, la liberación de prostaglandinas y principalmente prostaglandina E₂, constituye un acontecimiento clave en el desarrollo de los signos cardinales de inflamación. Dada su potente propiedad vasodilatadora, la prostaglandina E₂ aumenta el flujo sanguíneo del tejido, lo que da como resultado el característico eritema. Por otra parte, junto con otros factores solubles incluyendo bradicinina, histamina y leucotrienos, aumenta la permeabilidad vascular contribuyendo a la extravasación de fluidos y a la aparición de edema. También actúa sobre terminaciones nerviosas sensoriales periféricas y médula espinal provocando hiperalgesia, y es un potente mediador pirético implicado en la aparición de fiebre (Clària, 2003).

II.4. Factor nuclear de transcripción κ B

NF- κ B es una familia de factores de transcripción, responsables de la regulación de complejos fenómenos, con un papel fundamental en el control de la señalización celular en el cuerpo bajo ciertas condiciones fisiológicas y también patológicas, dado que este factor de transcripción es uno de los reguladores clave de genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria. NF- κ B es activado por estímulos proinflamatorios como mitógenos, citocinas inflamatorias, radiación ultravioleta, radiación ionizante, proteínas virales, ROS, TNF- α y LPS. La activación está mediada por diversos receptores como TLRs y NLRs, éstos últimos considerados a menudo los homólogos citoplasmáticos de TLRs (Surh *et al.*, 2001; Nam, 2006; Pal *et al.*, 2014).

NF- κ B hace referencia a un grupo de cinco proteínas bien caracterizadas, inducibles y ubicuas, estructuralmente relacionadas y conservadas en los mamíferos, a saber: RelA o p65, Rel o cRel, RelB, NF- κ B1 o p50 y NF- κ B2 o p52. Las p50 y p52 se sintetizan como precursores más grandes, p105 y p100 respectivamente. El NF- κ B funcionalmente activo existe principalmente como un heterodímero, siendo más abundante el heterodímero p50/p65. Excepto p50/p50 y p52/p52 que están implicados en la represión de la transcripción, la mayoría de los heterodímeros actúan como activadores transcripcionales. La principal regulación en la actividad de NF- κ B, se realiza a través del control en la translocación de NF- κ B entre el citoplasma y el núcleo, mediante una complicada serie de eventos de transducción de señales intracelulares en respuesta a estímulos externos (**Figura 8**). En células no estimuladas, la mayor parte del NF- κ B celular está secuestrado en el citoplasma mediante la unión con la proteína I κ B (de *Inhibitor of κ B* en inglés), evitando que se mueva hacia el núcleo celular. En el complejo I κ B - NF- κ B, la señal de localización nuclear de la subunidad de NF- κ B está enmascarada por repeticiones de anquirina (Madonna *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2014).

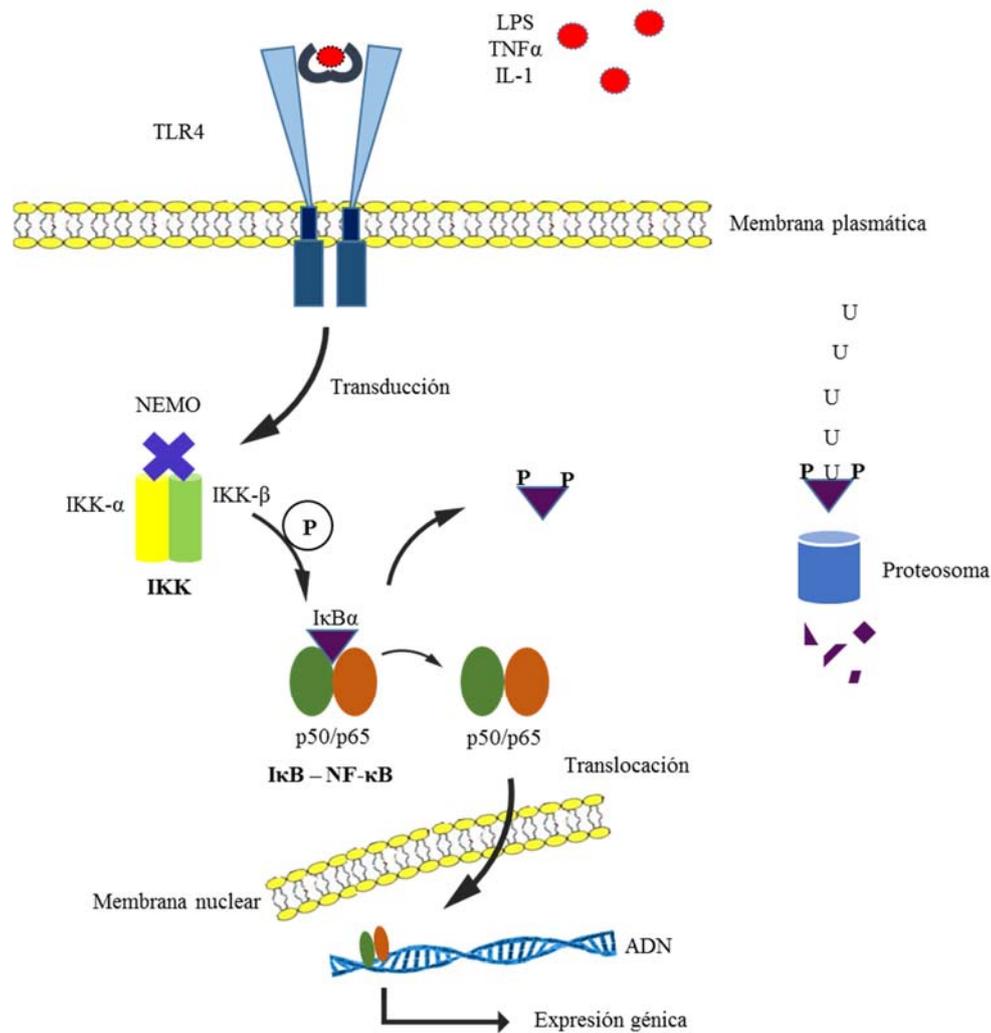


Figura 8. Activación de NF- κ B por la vía clásica.

En la vía dependiente de MyD88 de la transducción de señales que se origina cuando el LPS activa a TLR4, MyD88 recluta y activa a la cinasa IRAK-4 (de *IL-1 Receptor-Associated Kinase-4* en inglés) que es responsable del subsiguiente reclutamiento, activación y degradación de IRAK-1 (ver también **Figura 6**). Otra proteína adaptadora crítica en la ruta dependiente de MyD88 posterior a IRAK-4 e IRAK-1 es TRAF6 (de *TNF Receptor-Associated Factor 6* en inglés). TRAF6 forma un complejo con UBC13 (de *Ubiquitin-Conjugating enzyme 13* en inglés) y UEV1A (de *Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 Variant 1 isoform A* en inglés), y activa TAK1 (de *Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1* en inglés). TAK1 entonces activa las vías IKK (de *I κ B Kinase* en inglés) y MAPK (de *Mitogen-Activated Protein Kinase* en inglés) (Gohda *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008).

En la vía IKK, proteínas cinasas específicas (IKK α , IKK β e IKK γ o NEMO) forman un complejo y fosforilan a I κ B, causando su poliubiquitinación y su rápida degradación por el proteosoma 26S (Zamudio-Arroyo *et al.*, 2012); NF- κ B queda disociado de I κ B y se trasladada hacia el núcleo, donde se une a secuencias de DNA específicas (motivos κ B) presentes en los promotores de numerosos genes diana, e induce la activación transcripcional de genes implicados en el control de la proliferación y crecimiento celular y en las respuestas inflamatorias como se observa en la **Figura 8**. Entre otras funciones, NF- κ B controla la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , etc.), quimiocinas (IL-8, MIP-1, MCP-1, RANTES, etc.), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, E-selectina), enzimas inducibles (COX-2 e iNOS), factores de crecimiento, algunas de las proteínas de fase aguda y receptores inmunes, todos los cuales desempeñan un papel crítico en el control de la mayoría de los procesos inflamatorios (Surh *et al.*, 2001; Nam, 2006; Lee *et al.*, 2007b; Lim *et al.*, 2010).

La activación de la vía MAPK conduce a la inducción de AP-1, otro factor de transcripción que interviene en la regulación de la homeostasis del tejido; y también controla importantes procesos como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la inflamación. Recientemente, varios informes han demostrado que AP-1 tienen un papel importante en enfermedades humanas, tales como psoriasis, fibrosis y el cáncer (Chang y Karin, 2001; Tak y Firestein, 2001; Uluçkan *et al.*, 2015).

Cuando NF- κ B se activa por estímulos inflamatorios como se explicó más arriba, a esa cascada de señalización se la denomina vía clásica o canónica y está asociada a la inmunidad innata. Sin embargo, existe otra vía asociada con la inmunidad adaptativa, designada vía alternativa o no canónica (**Figura 9**); BAFF (de *B cell Activating Factor* en inglés), el ligando de CD40, LT β (de *Lymphotoxin* β en inglés) y el ligando de RANK (de *Receptor Activator of NF- κ B* en inglés) son los estímulos responsables de su activación. La IKK, que estructuralmente es un complejo, es un regulador crítico de la vía de activación de NF- κ B. En la vía canónica, son absolutamente necesarias las subunidades IKK β e IKK γ (también llamada NEMO). En contraste, en la vía no canónica es crítica la presencia de IKK α y de NIK (de *NF- κ B Inducing Kinase* en inglés) que es esencial para la fosforilación y activación de IKK α y subsecuente activación de NF- κ B2 como se observa en la **Figura 9** (Liu *et al.*, 2012; Gray, 2014).

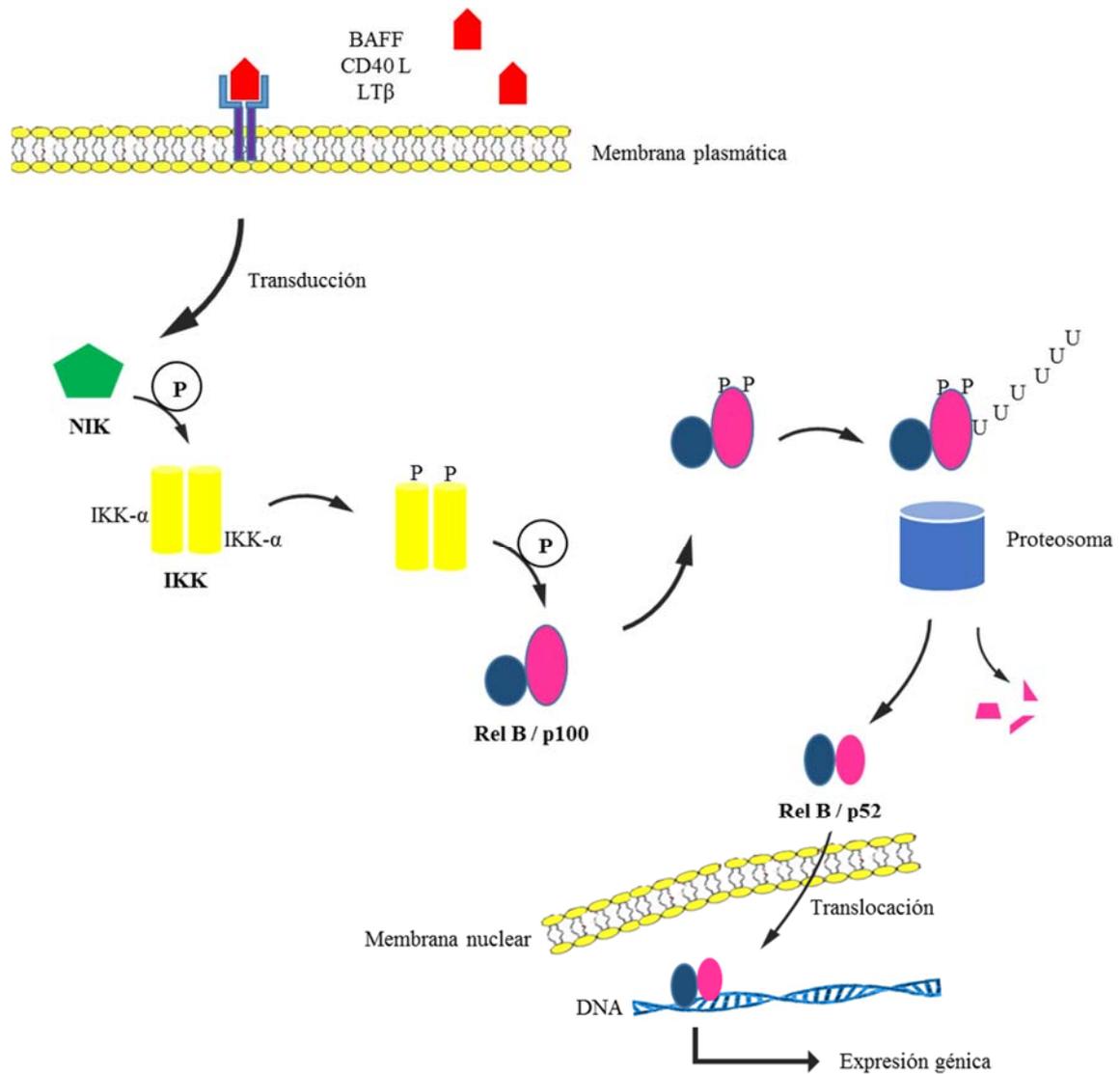


Figura 9. Activación de NF-κB por la vía alternativa.

Dado que la activación de NF-κB es responsable de la transcripción de muchos factores inflamatorios, y la inflamación crónica se asocia con una activación constitutiva de NF-κB como resultado ya sea de un desequilibrio en la red de señalización inflamatoria como de un mecanismo antiinflamatorio ineficiente o una infección persistente, la maquinaria transcripcional de este factor nuclear, es decir, el mismo NF-κB y las rutas de señalización que regulan su actividad, se han convertido en un punto central para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios e inmunomoduladores. La disminución de la activación de NF-κB podría estar mediada a través de diferentes mecanismos: por bloqueo de la degradación de IκB mediada por IKK, por inhibición de la señal que conduce a la activación de IKK y la subsecuente fosforilación /degradación de IκB, y por supresión de la interacción

de NF- κ B con el DNA sin afectar la degradación de I κ B (Surh *et al.*, 2001; Nam, 2006; Izzi *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2014).

II.5. Tratamientos antiinflamatorios

Los principales medicamentos antiinflamatorios son los glucocorticoides y los AINEs.

Los glucocorticoides son hormonas sintetizadas por la corteza suprarrenal, tienen estructura esteroidea (con núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno) y acción reguladora del metabolismo de los carbohidratos. Además, son mediadores antiinflamatorios endógenos potentes, liberados en minutos en respuesta al estrés y lesión tisular para controlar la severidad de la respuesta inflamatoria, funcionando como un freno interno contra una potencial reacción inflamatoria exagerada desplegada por el huésped (Munck *et al.*, 1984).

En las décadas de 1950 y de 1960 se sintetizaron la mayoría de los glucocorticoides, y se estudiaron su metabolismo y su vida media, clasificándolos en glucocorticoides de vida media corta, mediana y prolongada; entre ellos: hidrocortisona (cortisol), prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona, beclometasona, flunisolida y fluprednisolona (Martínez Cordero *et al.*, 2010). Son los agentes más potentes y eficaces en el control de las enfermedades inflamatorias crónicas. Los esteroides inhalados se habían convertido en la terapia de primera línea para el asma crónica (Barnes y Adcock, 1993); y las formas inyectables intramusculares o en infiltraciones intraarticulares, tópicos (colirios y cremas) y orales (gotas, jarabes y comprimidos), tienen amplio uso actual en crisis asmáticas severas, artritis reumatoide, tendinitis, lumbalgias, conjuntivitis, dermatitis, rinitis y lupus entre otras patologías.

Sin embargo, muchos son los efectos indeseados a altas dosis o en administraciones prolongadas: atrofia de la piel, alteración en la cicatrización de heridas, osteoporosis, atrofia muscular, cataratas, glaucoma, diabetes mellitus, insuficiencia adrenal, síndrome de Cushing, alteraciones en el estado de ánimo, la conducta, la memoria y la cognición, hipogonadismo, hipertensión, dislipidemia, trombosis, úlcera péptica, hemorragia gastrointestinal, pancreatitis y riesgo aumentado a contraer infecciones (Schäcke *et al.*, 2002; Huscher *et al.*, 2009).

Por otro lado, los AINEs son los fármacos más extensamente utilizados, se los receta para molestias reumáticas y dolencias musculoesqueléticas, y con mucha frecuencia se los toma sin prescripción médica para dolores menores. Es un grupo de compuestos muy diversos

estructuralmente que comparten actividad antiinflamatoria, y además la mayoría presentan efecto analgésico y antipirético. El compuesto prototipo es la aspirina, motivo por el cual este grupo también es conocido como “fármacos similares a aspirina” (Brunton *et al.*, 2011; Vane y Botting, 1998).

Una clasificación química general se muestra en la **Tabla 2** (Rainsford, 2007).

Tabla 2. Principales AINEs. Clasificación.

Ácidos carboxílicos	Carboxamidas u Oxicams	Sulfonanilida	Pirazoles y Furanonas diaril sustituidos
Aspirina Diflunisal Ácido flufenámico Ácido mefenámico Indometacina Sulindac Diclofenac Ketorolac Ibuprofeno Ketoprofeno Flurbiprofeno Naproxeno	Piroxicam Meloxicam	Nimesulida	Celecoxib Etoricoxib

Los AINEs producen su efecto antiinflamatorio a través de la inhibición de la COX, evitando de este modo la formación de prostaglandinas. Aquellos compuestos no selectivos, que inhiben tanto a COX-1 como COX-2, presentan además de la actividad antiinflamatoria, efectos adversos indeseados fundamentalmente en el tracto gastrointestinal, adjudicados a la inhibición de la enzima constitutiva COX-1, presente principalmente en estómago y responsable de la producción fisiológica de prostaglandinas protectoras de la mucosa gástrica (Willoughby *et al.*, 2000). COX-1 también está presente en las plaquetas, donde las prostaglandinas son transformadas en tromboxano A₂, cuya liberación promueve la agregación plaquetaria y vasoconstricción; lo cual explica el efecto antitrombótico adjudicado a los agentes no selectivos (Boban *et al.*, 2016). Los inhibidores selectivos de COX-2, enzima inducible responsable de la producción de prostaglandinas vinculadas a la respuesta inflamatoria, mantienen la deseada actividad antiinflamatoria y al mismo tiempo tienen un

menor potencial de efectos adversos gástricos (Dalen, 2002). Sin embargo, la nueva generación de AINEs, los inhibidores altamente selectivos de COX-2, también denominados coxib, tampoco están exentos de efectos adversos (Gislason *et al.*, 2006). A finales del año 2004, rofecoxib fue retirado del mercado por causar graves eventos cardiovasculares (Willoughby *et al.*, 2000). A partir de entonces, todos los coxib fueron sospechosos de aumentar el riesgo cardiovascular y el tema aun genera controversias (Khan y Fraser, 2012).

El tratamiento de las enfermedades inflamatorias, actualmente se basa como acabamos de ver, en la interrupción de la síntesis o acción de los mediadores que impulsan la respuesta del huésped. Los antiinflamatorios esteroides, los AINEs y también los antihistamínicos (indicados principalmente para el alivio temporario de los síntomas causados por alergias respiratorias), fueron desarrollados sobre esta base (Gilroy *et al.*, 2004).

El concepto establecido hace 200 años que la inflamación es una respuesta defensiva, y que el conocimiento actual ha confirmado, conduce a pensar que la respuesta inflamatoria no se debe bloquear; y los esfuerzos terapéuticos eficaces van encaminados a modular la respuesta inflamatoria para evitar la liberación desordenada de mediadores que convierten su efecto defensivo en deletéreo (Ruibal León *et al.*, 2004). Además, se hace cada vez más evidente que para enfermedades complejas como la inflamación, la capacidad de interacción de un fármaco con múltiples dianas moleculares es superior a la dirigida a un único factor clave en cuanto a eficiencia, efectos secundarios adversos y mecanismos compensatorios (Koeberle y Werz, 2014).

En consecuencia, se ha generado gran interés sobre una amplia gama de compuestos fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides, cuyos informes demuestran efectividad en la modulación de la respuesta inflamatoria. El esfuerzo dirigido hacia el descubrimiento de agentes antiinflamatorios de origen vegetal, resultó en la invención de por lo menos 43 formulaciones patentadas entre los años 1987 y 2011, y varios fitofármacos tienen uso clínico actual y otros se encuentran sometidos a ensayos clínicos de fase II y fase III (Bellik *et al.*, 2012).

II.6. Productos naturales con actividad antiinflamatoria.

Desde tiempos inmemoriales los hombres recurrieron a la naturaleza para aliviar el dolor y curar enfermedades. Entre los productos naturales disponibles, pronto destacaron los de origen vegetal, siendo este reino la principal fuente de preparaciones farmacéuticas.

Todos los sistemas medicinales más antiguos, independientemente de sus ideas filosóficas, emplearon las plantas para el tratamiento de enfermedades, pero cómo y cuándo fueron usadas por primera vez, es información que quedó perdida en la prehistoria; sin embargo, después de la transmisión oral de los conocimientos médicos, llegó el uso de la escritura en papiros, tablas de arcilla cocida y pergaminos: registros arqueológicos que se conservaron hasta nuestros tiempos y dan prueba de ellos.

En la Medicina egipcia antigua, el uso de plantas quedó documentado entre otros en el Papiro Ebers, escrito aproximadamente en el año 1600 a.C. Es uno de los tratados médicos más antiguos en el que se encuentran cerca de 10 000 recetas médicas, muchas de ellas formuladas con compuestos de origen vegetal como mirra, aloe, loto, incienso, gomas, resinas, extractos de raíces y semillas de cilantro entre otros (Wiedeman y Bayer, 1983; Balabanova *et al.*, 1992; Karenberg y Leitz, 2001).

Los escritos cuneiformes sumerios y asirios, que fueron encontrados unos 660 redactados aproximadamente en el año 650 a.C., también constituyen otro registro del uso de plantas con fines medicinales (Majno, 1991; Evans, 2009; Gu *et al.*, 2014).

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud definió Medicina Tradicional como un término amplio utilizado para referirse a la medicina tradicional china, Ayurveda, Unani y diversas formas de medicina indígena cuyas terapias incluyen el uso de medicamentos a base de plantas, partes de animales y/o minerales, y terapias sin medicamentos como es el caso de la acupuntura, terapias manuales y las terapias espirituales (Rezaeizadeh *et al.*, 2009).

Ayurveda es el nombre de la medicina tradicional de la India, la más antigua, su historia se remonta al año 5000 a.C. pero sus conceptos característicos parecen haber sido consolidados entre el 2500 y el 500 a.C. El Charaka Samhita (1900 a.C.) es el libro más antiguo totalmente dedicado al concepto de la práctica de Ayurveda, y en él se describen 341 plantas y productos vegetales para su uso en medicina. El siguiente punto de referencia de la literatura ayurvédica fue el Sushruta Samhita (600 a.C.), y en él se hace hincapié en métodos quirúrgicos y se describen 395 plantas medicinales como agentes terapéuticos (Mukherjee, 2001; Mukherjee y Wahile, 2006; Dwivedi y Dwivedi, 2007; Ravishankar y Shukla, 2007).

La Medicina Tradicional China y de otras regiones de Asia como Japón y el Tíbet, tiene su origen aproximadamente en el año 1300 a.C. y se hallaron textos que datan del año 400 a.C. Emplea para la elaboración de sus recetas más de 11 000 especies de plantas, y las

formulaciones están compuestas típicamente por 10 a 15 hierbas (Cheng, 2000; Yu *et al.*, 2006; Evans, 2009; Liu *et al.*, 2013).

En la antigua Grecia, Hipócrates (460 - 377 a.C.), fundador de la escuela que lleva su nombre y conocido como “el padre de la medicina”, recomendaba el jugo de álamo para el tratamiento de enfermedades de los ojos y el de la corteza de sauce para aliviar el dolor del parto y para reducir la fiebre. Teofrasto (372 - 288 a. C.), discípulo del filósofo griego Aristóteles escribió “De historia plantarum” que recopilaba en nueve volúmenes todo lo referente a morfología, descripción, clasificación, geobotánica y farmacognosia de las plantas conocidas por los antiguos griegos. En Roma, Plinio (23 – 79 d.C.) escribió la enciclopedia “Naturalis historia” compuesta por treinta y siete volúmenes, de los cuales la mitad se dedicaron a la botánica, en ellos recopiló todo el saber de su tiempo respecto a las plantas. También en Roma, Celso (25 a.C. - 50 d.C.), a quien se debe la descripción de los signos cardinales de la inflamación, usaba extractos de hojas de sauce para aliviarlos. Dioscórides (40 – 90 d.C.), cirujano del ejército romano en la época del emperador Nerón y contemporáneo a Plinio, escribió “De materia medica”, una obra de 5 volúmenes en la que se describen 600 plantas medicinales (Vane y Botting, 1998; Bueno, 2008).

Más tarde aparece el Sistema Unani, también conocido como Medicina islámica o Medicina árabe. Es otro sistema de medicina tradicional empleado en Asia del sur que tiene sus orígenes en Grecia y se basa en las doctrinas de Hipócrates y Galeno (130 – 216 d.C.). En ella, también las plantas tienen un rol principal y constituyen su columna vertebral (Borins, 1987; Mukherjee, 2001).

Ya en la Nueva España, existe documentación que prueba que se exigía un amplio conocimiento en botánica a quienes se dedicaban a ejercer la medicina. La segunda disposición de las “Ordenanzas para aprovechar las cofradías a los que han de servir en el hospital” (redactadas en idioma *náhuatl* bajo la supervisión de fray Alonso de Molina hacia mediados del siglo XVI) formulaba un precepto muy claro: “Auh cenca huey in tlatlacol yez in cofriasmeh intla quicallaquizqueh in titicih hospital tel callaquizqueh in nelti tlamatinimeh in quiximatih in zacapahtli in quenami nepapan cocoliztli...”. O sea, en la traducción de León-Portilla: “Un muy gran servicio de los cófrades será que hagan entrar al hospital a los *titicih*, médicos, pero que entren los que son *tlamatinimeh*, sabios verdaderos, los que conocen por experiencia las hierbas medicinales y de qué condición son las diversas enfermedades...” (de Micheli-Serra, 1998).

Los pueblos originarios de América no son una excepción. Las poblaciones de Ecuador, Colombia, Brasil, Venezuela, Perú y Bolivia, distribuidas en la selva tropical del Amazonas, la más extensa del mundo y con una riquísima biodiversidad, viviendo en asociación íntima con el medio ambiente, han acumulado conocimiento a través de siglos de experimentación, y como resultado tienen su propia y vasta farmacopea vegetal. Los chamanes y curanderos son los guardianes de las tradiciones tribales y tienen amplio conocimiento de las propiedades y usos de la vegetación local (Plotkin y Balick, 1984; Abreu Guirado y Cuéllar Cuéllar, 2008; Shultes y Raffauf, 2009).

Sin embargo, sólo pudo encontrarse una base científica sólida para el uso de estas drogas vegetales después del aislamiento y el estudio de sus principios activos; y éstos, bajo la forma de sustancias químicamente definidas, no fueron extraídos del mundo vegetal hasta finales del siglo XVIII, cuando Scheele separaba los primeros ácidos orgánicos: oxálico, cítrico, málico y tartárico (Vickery y Pucher, 1940). A principios del siglo XIX Derosne aisló morfina del opio (Casado *et al.*, 1984); Pelletier y Caventou estricnina de las semillas de nuez vómica en 1818, y quinina de la corteza de quina en 1820 (Smith, 1976); y este mismo año Robiquet extraía cafeína de las semillas del cafeto (Wisniak, 2013). Los primeros heterósidos se aislaron al mismo tiempo: salicina de la corteza del sauce por Leroux en 1830, amigdalina de las almendras amargas por Robiquet en el mismo año y digitalina de las hojas de dedalera por Nativelle en 1868 (Haas, 1983; Linares Casas, 2015).

Los avances en el campo de la química condujeron al conocimiento de la composición de los vegetales, y poco a poco, a la definición de la noción de principio activo. Mientras tanto, se inició un nuevo aspecto en el estudio de las drogas con el desarrollo de la fisiología. Fue mérito de Claude Bernard (1813-1888) verificar la actividad terapéutica de vegetales que habían sido empleados durante largo tiempo en medicina popular, y especificar su modo de acción en diferentes órganos animales por medio de ensayos farmacológicos (Bernard, 1865). Estos análisis experimentales, también llevados a cabo con los principios activos aislados, favorecieron el proceso por el cual, cada vez más a menudo, llegaron a sustituir en la aplicación terapéutica a las drogas vegetales que los contenían (De Pascuale, 1984).

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas implica un enfoque multidisciplinario que reúne conocimientos sobre botánica, etnobotánica, técnicas de fitoquímica y ensayos biológicos. La revisión histórica del uso de drogas vegetales muestra cómo se han ido configurando y desarrollando los tres aspectos particulares de la Farmacognosia moderna: el estudio botánico de las drogas vegetales y su examen morfológico, lo que resulta en la

definición de sus características macroscópicas y microscópicas útiles para su identificación; el estudio de su composición química y por lo tanto la determinación de la naturaleza y estructura de todos sus componentes activos; y el estudio de la actividad farmacológica de la que depende su uso terapéutico (De Pascuale, 1984).

La mayoría de los principios activos derivados de productos naturales, fueron descubiertos primero por ensayos celulares *in vitro* tradicionales (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, de citotoxicidad) antes de que su diana molecular real fuera identificada. Esas respuestas celulares están asociadas con las propiedades inherentes de los metabolitos secundarios en la defensa de sus organismos productores. Hoy, con el advenimiento de la investigación genómica y herramientas más nuevas de biología molecular, son empleados rutinariamente además de los bioensayos tradicionales, ensayos biológicos más sofisticados en el descubrimiento de fármacos, estando orientados muchas veces sobre la base de la práctica en la medicina tradicional local (Shu, 1998; Lam, 2007; Abreu Guirado y Cuéllar Cuéllar, 2008).

Los productos naturales todavía representan una fuente inigualable de diversidad molecular en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, y son de hecho complementarios a fuentes moleculares emergentes, tales como las bibliotecas combinatorias (Shu, 1998; Harvey, 2007).

Revisiones actuales, continúan señalando la utilidad de los productos naturales como fuente de nuevas estructuras, aunque no necesariamente resulten en la entidad final del fármaco, y manifiestan que aunque las técnicas de química combinatoria resultan exitosas como métodos de optimización de estructuras, no resultan tan efectivas en la obtención de compuestos *de novo*. Además, ha surgido una nueva designación en la clasificación de productos naturales: los “NB” (de *Natural Product Botanical*, en inglés), para cubrir aquellas “mezclas definidas de metabolitos de origen vegetal” que han sido reconocidas como entidades medicamentosas por la FDA (*Food and Drug Administration*, en inglés) y organizaciones similares (Newman y Cragg, 2012).

Muchos estudios han demostrado el efecto positivo que ejercen los compuestos de origen vegetal sobre la respuesta inflamatoria, actuando como inhibidores de moléculas claves tales como LOX, COX-2, iNOS, NF- κ B, algunas citocinas y otros mediadores inflamatorios. Para enfermedades complejas como la inflamación, los beneficios de fármacos capaces de interferir con múltiples dianas moleculares son incuestionables. El efecto sinergista de afectar múltiples

blancos, resulta en mejoras en la eficacia con efectos adversos disminuidos (Rubió *et al.*, 2013; Meirer *et al.*, 2014).

Orlikova *et al.* (2014), examinaron el efecto modulador de los productos naturales sobre COX-2 a nivel transcripcional, posttranscripcional y posttraduccional. Ríos *et al.* (2009) y Bremner y Heinrich (2002) revisaron el efecto de los productos naturales sobre NF- κ B y otros factores nucleares de transcripción. Calixto *et al.* (2003 y 2004) consideraron las propiedades antiinflamatorias de productos naturales de origen vegetal y correlacionaron sus acciones con la modulación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, metabolitos del ácido araquidónico, iNOS y NF- κ B.

Los fitoquímicos más relevantes, tradicionalmente han sido los alcaloides, los compuestos fenólicos y los terpenoides (Bader *et al.*, 2014); aunque la incorporación de nuevos fármacos del grupo de los alcaloides, en los últimos 20 años ha sido limitada (Ríos *et al.*, 2009).

Los alcaloides demostraron ser los principales componentes bioactivos en los tratamientos antiinflamatorios. Un ejemplo importante es matrina, el principal alcaloide obtenido de la raíz de *Sophora flavescens* Ait., utilizada en medicina tradicional china para tratar enfermedades inflamatorias tales como enteritis, hepatitis y dermatitis atópica. Varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que matrina ejerce efectos antiinflamatorios por inhibir la activación de la señal inflamatoria y la producción de mediadores proinflamatorios en queratinocitos de piel humana, fibroblastos, células de Kupffer y células endoteliales microvasculares intestinales de rata, y disminuir el aumento en los niveles de TNF- α , IL-6 y HMGB1 (de *High-Mobility Group Box 1 protein*, en inglés) inducida por LPS (Wang *et al.*, 2013a).

Probablemente el grupo fitoquímico más comúnmente investigado sea el de los flavonoides, el más numeroso entre los fenoles vegetales. Las revisiones de Middleton *et al.* (2000), Harborne y Williams (2000), Havsteen *et al.* (2002) y Agrawal (2011) constituyen una amplia compilación de datos de este grupo de compuestos.

Los efectos antiinflamatorios de los flavonoides han sido ampliamente estudiados y documentados en ensayos de modelos inflamatorios *in vivo* y a nivel celular (Kim *et al.*, 2004; Talhouk *et al.*, 2007; Ríos *et al.*, 2009). Manthey se concentró en el efecto inhibitorio de los flavonoides en la respuesta inflamatoria asociada a insuficiencia venosa crónica (Manthey, 2000). Olszanecki *et al.* (2002) probaron el efecto de compuestos pertenecientes a 4 grupos principales de flavonoides sobre la inducción y actividad de iNOS en modelos *in vitro* de

macrófagos tratados con LPS. Rathee *et al.* (2009) y Serafini *et al.* (2010) revisaron los mecanismos de acción de los flavonoides como antiinflamatorios. Pan *et al.* (2010) resumieron los conocimientos actuales y los mecanismos sobre la actividad antiinflamatoria de los flavonoides y sus efectos implicados en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias crónicas.

Otro grupo que ha sido extensamente investigado como fuente de agentes farmacológicos es el de los terpenoides, y algunos han mostrado poseer propiedades antiinflamatorias específicas (Akihisa *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2003, 2004). Moléculas representantes de los diferentes grupos de terpenoides como monoterpenos, lactonas sesquiterpénica, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos manifestaron potencial antiinflamatorio por interferir en la señalización de NF- κ B (Salminen *et al.*, 2008; de las Heras y Hortelano, 2009). Más específicamente, varios miembros de la familia de los diterpenoides kauranos resultaron efectivos inhibidores de iNOS, afectado distintos blancos dentro de la cascada de activación de NF- κ B tales como el complejo IKK, la degradación de I κ B, la translocación de NF- κ B y su unión al DNA (Bremner y Heinrich, 2002).

En general, los productos naturales exhiben baja afinidad hacia una diana molecular única, y sin embargo, elevada eficacia *in vivo*. El potencial de los productos naturales, utilizados por la medicina tradicional, con mecanismos de acción a menudo desconocidos pero probada eficacia y seguridad clínica, ha sido considerado como punto de partida para el descubrimiento de fármacos que interaccionen con múltiples blancos (Harvey, 2008; Koeberle y Werz, 2014).

II.7. Especies objeto de estudio

II.7.1. *Isodon xerophilus* (C.Y. Wu et H.W. Li) H. Hara

Isodon xerophilus es sinónimo de *Rabdosia xerophila* C. Y. Wu et H. W. Li. El nombre común de *I. xerophilus* en China es “han sheng xiang cha cai” (Li y Hedge, 1994).

II.7.1.1. Descripción botánica y distribución

Isodon xerophilus (C.Y. Wu et H.W. Li) H. Hara (Lamiaceae) es un arbusto perenne de aproximadamente 1 m de altura (**Figura 10**). Los tallos, glabros, de color pardo grisáceo, están muy ramificados; sus ramitas, antrorsas, son de color amarillo violáceo y densamente velutinas. Las hojas presentan un limbo ovado oblongo, papiráceo, de 1.0 a 2.5 cm \times 0.5 a 1.5 cm, peciolo

de 1 a 3 mm, la superficie adaxial rugosa y pubescente, la abaxial de color gris, violáceo a lo largo de las nervaduras, y densamente pubescente; base redondeada, margen crenulado por encima de la base y ápice agudo. Panículas estrechas de 3.5 a 10 cm, terminales y axilares, con pubescencia antrorsa; también cimbras, de 3 a 5 flores. Las hojas de las ramas floríferas son más cortas, ovadas, de margen serrulado y ápice acuminado. El cáliz es campanulado, levemente bilabiado, de aproximadamente 3 mm, densamente pubescente; con dientes calicinos casi iguales, ampliamente triangulares, aproximadamente de un tercio de la longitud del cáliz. La corola de 8 mm, es bilabiada y pubescente, el tubo corolino de unos 3 mm, el labio superior de 3 mm y el inferior de 5 mm. Estambres inclusos o ligeramente exsertos. Estilo inclusivo. Semillas de color pardo amarillento, ovoides, de aproximadamente 1 mm, glabras. Florece en los meses de octubre y noviembre y fructifica en noviembre o diciembre (Yueqin, 2007).

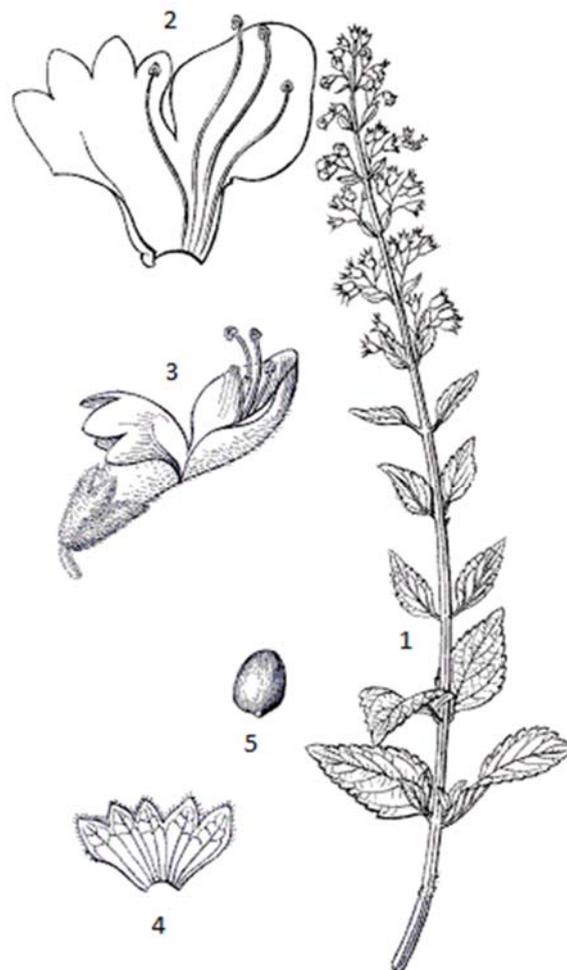


Figura 10. *Isodon xerophilus*: 1. Porción superior de la planta mostrando inflorescencia. 2. Corola abierta mostrando estambres. 3. Flor entera. 4. Caliz abierto en vista adaxial. 5. Fruto (aquenio). Tomada de http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=4523&flora_id=2

Esta planta es originaria de Yunnan, provincia de China, conocida por su complicada topografía con altitudes que van desde 76 a 6 740 metros por encima del nivel del mar y con siete zonas climáticas y ecológicas, desde la selva tropical al desierto alpino frío; y que debido a su rica biodiversidad es conocida en China como el reino de las plantas y los animales. Más de 17 000 especies de plantas con semillas han sido registrada allí, el 56.7% del número total de todo el país. *I. xerophilus* crece en esta región, sobre las laderas soleadas, entre 1 000 y 1 300 m de altura (Wu y Raven, 1994; Ji *et al.*, 2004).

A continuación se expone la clave taxonómica con los caracteres botánicos morfológicos que sirven para determinar la identidad de las distintas especies del género *Isodon*; entre ellos, los que conducen a *I. xerophilus* (Xiang y Liu, 2012).

1. Hojas en verticilos de 3-4.....	<i>I. temifolius</i>
1. Hojas siempre opuestas.....	2
2. Cáliz con 5 dientes iguales, erecto.....	3
3. Tallos e inflorescencias densamente tomentosos púrpura o amarronado.....	<i>I. enaderianus</i>
3. Tallos e inflorescencias con indumento distinto al anterior.....	4
4. Hojas largamente pecioladas; cáliz lanoso gris.....	<i>I. erioealyx</i>
4. Hojas sésiles o cortamente pecioladas; cáliz piloso.....	5
5. Hojas ovadas, peciolo de 1-6 mm de largo.....	<i>I. phyllostachys</i>
5. Hojas ampliamente ovadas, sésiles.....	<i>I. pantadenius</i>
2. Cáliz con 5 dientes casi iguales o bilabiado, curvado.....	6
6. Corola de 1.2-2.0 cm.....	7
7. Cáliz campanulado, no pigmentado de púrpura.....	<i>I. bulleyanus</i>
7. Cáliz ampliamente campanulado, púrpura o rojo violáceo oscuro.....	8
8. Tallos cuadrangulares; panículas fuertemente difusas.....	<i>I. forrestii</i>
8. Tallos cilíndricos; panículas ligeramente difusas.....	9
9. Plantas de 30-100 cm; hojas ovadas; disposición densa de cimas, 3-7 floridas.....	<i>I. irroratus</i>
9. Plantas de 15-20 cm; hojas apenas ovadas; disposición dispersa de cimas, 1 florida.....	<i>I. wui</i>
6. Corola inferior a 1.2 cm.....	10
10. Cáliz con 5 dientes casi iguales o discretamente bilabiado.....	11
11. Tubo de la corola recto, dientes del cáliz menores a 5 mm.....	12
12. Corola generalmente amarilla o amarillenta.....	<i>I. flavidus</i>
12. Corola blanca, rosa o azul.....	13
13. Hojas apenas lanceoladas a elípticamente lanceoladas, base apenas cuneada, margen remotamente serrado por encima del medio.....	<i>I. walkeri</i>
13. Hojas ovadas a ovadas lanceoladas, base redondeada a atenuadamente cuneada, margen crenado o serrado excepto en la base.....	14
14. Inflorescencia tomentulosa gris.....	<i>I. calcicohts</i>
14. Inflorescencias con pelos nunca grises.....	15

15. Inflorescencias aterciopeladas papiladas; hojas escamosas hirsutas, especialmente en la nervadura y venas de la superficie abaxial.....	<i>I. yuennanensis</i>
15. Inflorescencias no aterciopeladas papiladas; hojas vellosas o hirsutas, especialmente en la nervadura y venas de la superficie abaxial.....	16
16. Cáliz densamente velloso.....	<i>I. hispidus</i>
16. Cáliz escasamente velloso.....	<i>I. lophanthoides</i>
11. Tubo de la corola inclinado; dientes del cáliz generalmente mayores a 5 mm.....	17
17. Cáliz con dientes que se extienden hasta la mitad o más.....	18
18. Cimas en panículas interrumpidas.....	<i>Í. interruptus</i>
18. Cimas en espigas estrechas continuas.....	19
19. Hojas casi circulares a ovada oblongas, 1.2-1.8 x 0.6-1.8 cm, fuertemente reticuladas... <i>I. scoparius</i>	
19. Hojas más grandes, discretamente reticuladas.....	20
20. Panículas terminales, 1.5-13 cm, cimas 3-5 floridas.....	<i>I. setschwanensis</i>
20. Panículas terminales o axilares, 20-30 cm, cimas 3-15 floridas.....	<i>I. Angustifolius</i>
17. Cáliz con dientes pequeños que nunca se extienden más de la mitad del cáliz.....	21
21. Ramitas, hojas y cálices escasamente pilosa; hojas usualmente no corrugadas.....	22
22. Hojas del tallo menores a 2 cm.....	<i>Í. glutinosus</i>
22. Hojas del tallo más de 2 cm.....	<i>I. pleiophyllus</i>
21. Ramitas, hojas y cálices con densidad variable de pelos; hojas en general corrugadas.....	23
23. Ramitas, hojas y cálices tomentosos estrellados.....	24
24. Dientes del cáliz aproximadamente 1/3 del tubo del cáliz.....	25
25. Hojas sin una glándula marrón en la superficie inferior de cada diente del ápice.....	<i>I. rugosus</i>
25. Hojas con una glándula marrón en la superficie inferior de cada diente del ápice.....	26
26. Panículas 8-20 cm.....	<i>I. leucophyllus</i>
26. Panículas 3-5 cm.....	<i>I. adenolomus</i>
24. Dientes del cáliz aproximadamente como el tubo del cáliz.....	27
27. Hojas 3-8 cm.....	<i>I. grandifolius</i>
27. Hojas menores a 2.5 cm.....	<i>I. oresbius</i>
23. Ramitas, hojas y cálices con pelos diferentes a los anteriores.....	28
28. Hojas notablemente descoloridas.....	29
29. Dientes de los cálices ligeramente triangulares.....	<i>I. wikstromioides</i>
29. Dientes de los cálices generalmente triangulares.....	<i>I. tenuifolius</i>
28. Hojas no descoloridas.....	30
30. Cimas sésiles o cortamente pedunculadas; ramitas, inflorescencias y cálices densamente hirsutos.....	<i>Í. hirtellus</i>
30. Cimas notablemente pedunculadas; ramitas, inflorescencias y cálices no hirsutos.....	31
31. Hojas ovadas lanceoladas.....	<i>I. loxothyrsus</i>
31. Hojas ovada oblongas, romboides a ovada triangulares.....	32
32. Hojas ovada oblongas, base redondeada.....	<i>I. xerophilus</i>
32. Hojas rombicas a ovada triangulares, base cuneada a truncada.....	<i>I. rugosiformis</i>
10. Cáliz notablemente bilabiado.....	33
33. Cimas poco floridas, axilares, en panículas racemosas terminales.....	34

34. Cymes in axils of mid and upper cauline leaves, which are not reduced upwards.....	<i>I. melissoides</i>
34. Cymes in axils of floral leaves, which are gradually reduced toward branched apex.....	<i>I. Adenanthu</i>
33. Cimas vagamente muy florecidas, a menudo notablemente pedunculadas.....	35
35. Labios del cáliz que se extienden hasta el medio del cáliz.....	36
36. Cimas en panículas estrechas.....	37
37. Estambres levemente exertos.....	<i>I. phyllopodus</i>
37. Estambres inclusos.....	<i>I. coetsa</i>
36. Cimas en panículas amplias.....	38
38. Corola amarilla.....	<i>I. sculponeatus</i>
38. Corola púrpura azulada.....	<i>I. Megathyrsus</i>
35. Labios del cáliz que se extienden debajo del medio del cáliz.....	39
39. Cimas en panículas estrechas.....	<i>I. exisoides</i>
39. Cimas en panículas amplias.....	40
40. Base de la lámina foliar no cordada.....	<i>I. weisiensis</i>
40. Base de la lámina foliar levemente cordada.....	41
41. Corola azul.....	<i>I. flabelliformis</i>
41. Corola blanquesina, amarilla pálido o amarilla, pigmentada de púrpura rojizo.....	<i>I. scrophularioides</i>

II.7.1.2. Uso en medicina tradicional

Isodon es un género de la familia Lamiaceae (Labiatae) con amplia distribución geográfica, principalmente en Asia tropical y subtropical que incluye cerca de 150 especies (Sun *et al.*, 2006).

Muchas especies de *Isodon* tienen una larga tradición de uso en medicina popular china. Por ejemplo, las hojas de *I. rubescens* (Hemsley) H. Hara, la especie más estudiada, es aún usada por los pobladores de la provincia de Henan para el tratamiento de infecciones respiratorias y gastrointestinales, así como en inflamación y cáncer (Zhang *et al.*, 2011); en 1977, se desarrolló en la República Popular de China, un extracto estandarizado de esta planta, utilizado en especialidades medicinales para el tratamiento de dolor de garganta e inflamación (Huang *et al.*, 2007). La especie *I. eriocalyx* (Dunn) Kudo, es usada por los pobladores de la provincia de Yunnan como agente antibacteriano y antiinflamatorio (Shen *et al.*, 1994), habiéndose demostrado su eficacia en el tratamiento de dolor de garganta e inflamación en diversos ensayos clínicos (Sun *et al.*, 2006). A la especie *I. serra* (Maximowicz) Kudo, se le adjudica actividad hepatoprotectora y antiinflamatoria (Zhou *et al.*, 2013). Las partes aéreas de *I. ternifolia* (D. Don) Kudo, *I. lophanthoides* (Buchanan-Hamilton ex D. Don) H. Hara e *I. megathyrsus* (Diels) Kudo, se emplean como agentes antimaláricos y antiinflamatorios y para el tratamiento de enteritis e ictericia (Sun *et al.*, 2006).

I. xerophilus, especie objeto de estudio en esta tesis doctoral, ha sido ampliamente usada como agente antitumoral, antiinflamatorio y antibacteriano por la población local de la provincia de Yunnan (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Las hojas utilizadas en la preparación de infusiones frías, conocidas con el nombre de “liang cha”, se administran para el tratamiento y la prevención del dolor de garganta y muscular, fiebre, congestión e inflamación asociados al resfriado común (Weng *et al.*, 2007).

II.7.1.3. Composición química.

El género *Isodon*, también llamado *Rabdosia*, es rico en compuestos diterpenoides, y atrajo considerable atención como fuente prolífica de nuevos productos naturales con diversas estructuras y propiedades biológicas. La primera investigación de diterpenoides provenientes de especies del género *Isodon* se remonta a 1910. Desde 1976, más de 50 especies de *Isodon* fueron investigadas sistemáticamente en China y más de 500 diterpenoides, incluidos kauranos, abietanos, labdanos, pimaranos, isopimaranos, giberelinas, clerodanos y atisaranos, fueron aislados y caracterizados hasta el año 1988 (Fujita *et al.*, 1988; He *et al.*, 2009).

A partir de extractos de hojas de *I. xerophilus* han sido aisladas e identificadas, un gran número de moléculas pertenecientes al grupo fitoquímico de los diterpenoides, más precisamente de la clase de los *ent*-kauranos y *ent*-abietanos. También fueron aislados e identificados algunos compuestos pertenecientes a diversos grupos, como ácidos alifáticos, lignanos y flavonoides entre otros (Li *et al.*, 2011). Y diez triterpenos identificados como ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido maslínico, ácido 2 α -hidroxiursólico, hederagenina, ácido 3 β ,23-dihidroxiurs-12-en-28-oico, ácido arjunólico, ácido asiático, ácido 2 α ,3 α ,24-trihidroxiolean-12-en-28-oico y ácido 2 α ,3 α ,24-trihidroxiurs-12-en-28-oico (Li *et al.*, 2012).

II.7.1.3.1. *ent*-kauranos

Los terpenoides son una gran familia de compuestos que incluyen entre otros fitoles, carotenoides, tocoferoles, esteroides y hormonas. Las plantas son una de las principales fuentes de gran diversidad de terpenoides; en ellas, algunos son vitales para el crecimiento y la supervivencia, ya que juegan un papel esencial en la conversión de la luz en energía química, en la coordinación y funcionamiento de los centros de reacción fotosintéticos; y otros, que forman parte de los denominados metabolitos secundarios, cumplen importantes roles en la respuesta al estrés o en los mecanismos de defensa. Pero a pesar de la gran diversidad estructural

y funcional, todos los terpenoides se originan a partir de la ruta biosintética del ácido mevalónico, y en su estructura química se distinguen unidades de isopreno (**Figura 11 A y B**) o variaciones de esta unidad (Barkovich y Liao, 2001; Pattanaik y Lindberg, 2015).

La primera parte de la biosíntesis es la generación de una unidad de C5, tal como IPP (isopentil difosfato) o DMAPP (dimetilalil difosfato). La ruta del ácido mevalónico es la vía clásica de formación de unidades de C5, primeramente demostrada en levaduras y mamíferos, y utilizada por arqueas, algunas bacterias y todos los organismos eucariotas; pero investigaciones más recientes indican la existencia de una segunda ruta en plantas superiores, primero detectada en bacterias, que también genera unidades de C5, la vía del gliceraldehido fosfato/ piruvato, como se observa en la **Figura 11 B** (Ashour *et al.*, 2010; Pattanaik y Lindberg, 2015).

La biosíntesis de todos los terpenoides implica la fusión de unidades de C5 con estructura isoprenoide, y su clasificación está basada en el número de tales unidades presentes en sus esqueletos. Las principales categorías están constituidas por compuestos con dos, tres, cuatro, seis y ocho unidades de isopreno denominadas monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos respectivamente como se representa en la **Figura 12** (McGarvey y Croteau, 1995).

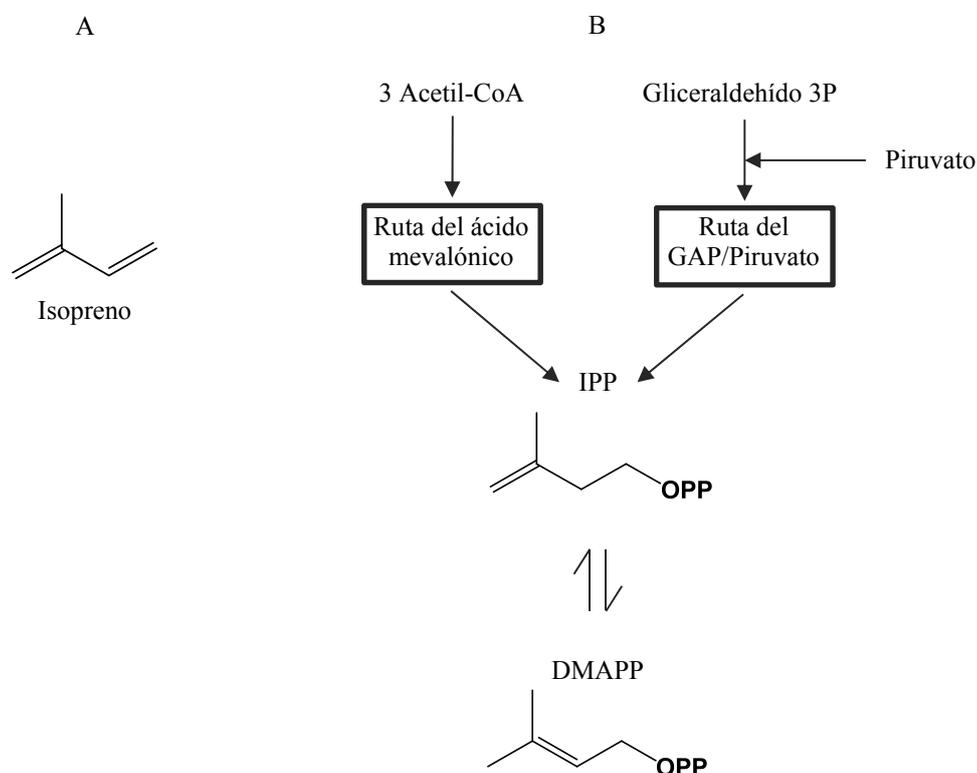


Figura 11. A) Estructura química del isopreno; B) Generación de precursores para la síntesis de terpenoides.

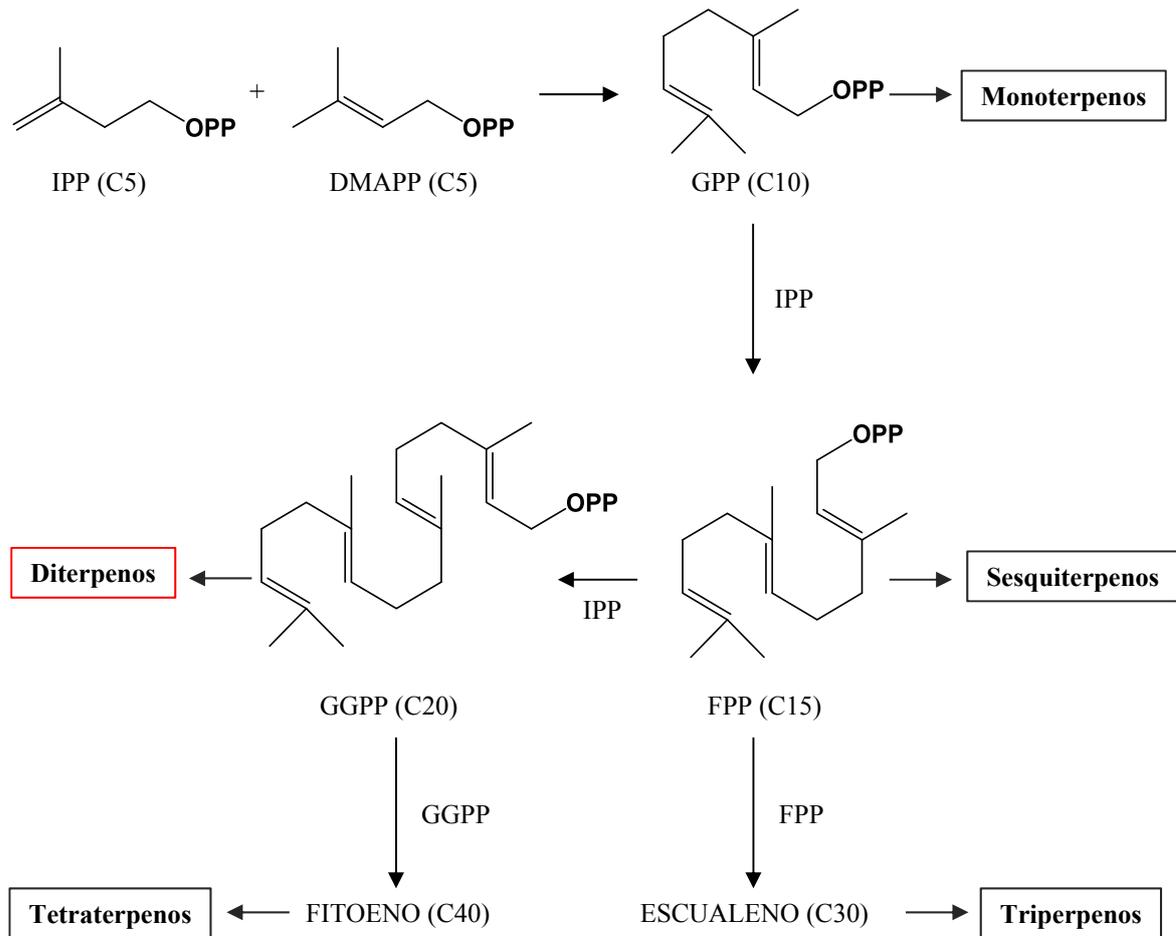


Figura 12. Síntesis de terpenoides. Destaca la formación de diterpenoides a partir de geranyl geranylpirofosfato.

Los diterpenos, o diterpenoides, son un extenso y variado grupo de compuestos que en su mayoría poseen veinte átomos de carbono; sin embargo, también se observan diterpenoides con más de veinte átomos de carbono y algunos con menos debido a transformaciones secundarias. La terminación “eno” para el nombre diterpeno, se debe a la presencia de insaturaciones en la molécula, pero debido a que estas moléculas también presentan otros grupos funcionales, actualmente se les da la terminación “oide”, siendo el nombre diterpenoide más común y general (Dev, 1989).

Los diterpenoides son biosintetizados a partir del GGPP (geranyl geranylpirofosfato) para originar estructuras tanto lineales como cíclicas. Las formas cíclicas comprenden compuestos que poseen dos, tres, cuatro y más anillos. Los diterpenoides bicíclicos incluyen a las series de los labdanos y clerodanos, los tricíclicos a pimaranos y abietanos y los tetracíclicos a los kauranos, beyeranos y giberilinas entre otros (**Figura 13**) (Yúfera, 1995; Bramley, 1997; Peña, 2008).

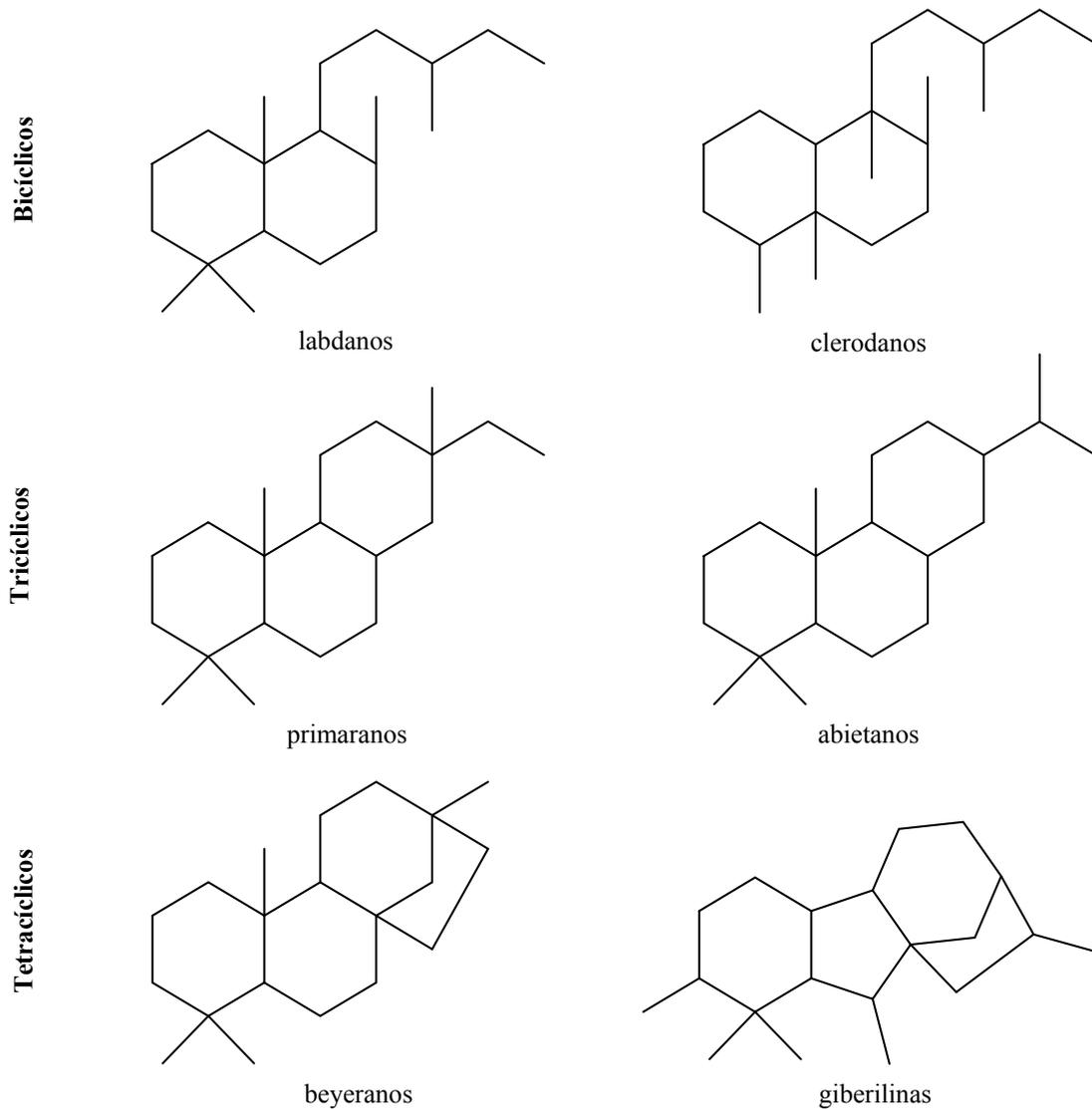


Figura 13. Núcleos químicos de diterpenoides cíclicos.

Así, los kauranos son diterpenoides tetracíclicos, cuya denominación proviene del nombre popular “kauri” con que se conoce a la especie *Agathis australis* (D. Don) Loudon (Araucariaceae) en Nueva Zelanda, de la que se aisló un diterpeno cristalino de fórmula $C_{20}H_{32}$ al cual se lo denominó trivialmente kaureno, y la terminación “eno” hace referencia el doble enlace entre los carbonos 16 y 17. Todas aquellas sustancias en las que se distingue este núcleo químico se agrupan bajo el nombre general de kauranoides (**Figura 14**). Los *ent*-kauranos tienen una configuración espacial distinta a los kauranos (**Figura 15**), y por esta razón se los identifica con el prefijo “*ent*” (abreviatura de enantiómero) que indica cambios en la

esteroquímica: la inversión en todos los centros quirales implicados en la estructura parental (Fujita, 1974; Dev, 1989; Peña, 2008).

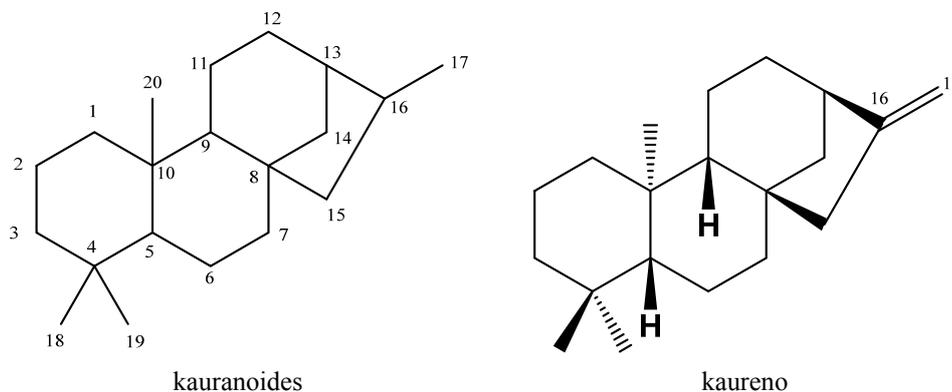


Figura 14. Estructura química del primer kauranoide aislado con nombre trivial kaureno y estructura del núcleo químico común a todos los kauranoides.

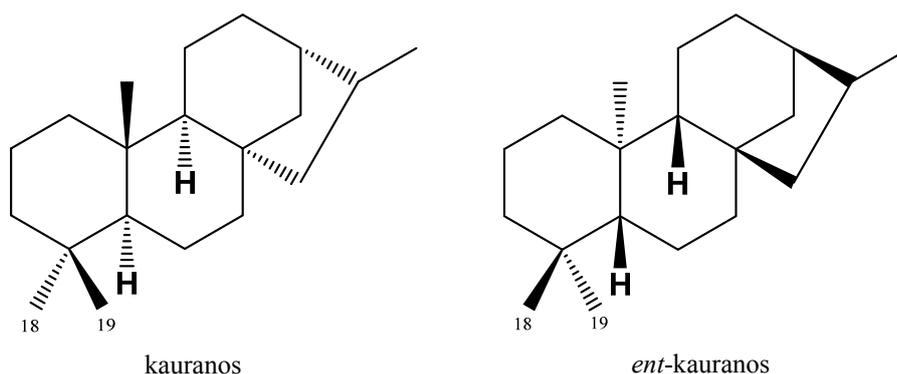


Figura 15. Estructuras químicas comunes de kauranos y *ent*-kauranos. Destacan las diferencias en la configuración espacial.

A partir de *I. xerophilus*, en el año 2000, Hou *et al.*, informaron el aislamiento y elucidación estructural de tres nuevos diterpenoides 7,20:14,20-diepoxi-*ent*-kauranos, llamados xerophilusin A, B y C, junto con uno conocido llamado macrocalin B (Hou *et al.*, 2000a).

Entre los años 2000 y 2001, se aislaron tres nuevos diterpenoides *ent*-kauranos llamados xerophilusin D, E y F, junto con siete compuestos conocidos: phyllostachysin A, ácido oleanólico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, rutina, quercetina-3-O- β -D-glucopiranosido, y quercetina (Hou *et al.*, 2000b; Hou *et al.*, 2001a). También cuatro nuevos 7,20-epoxi-*ent*-kauranos llamados xerophilusin G, I, J y K, junto con otros cuatro ya conocidos, enanderianin C, rosthorin A, longikaurin B y rabdoternin D (Hou *et al.*, 2001b).

En el año 2002 fueron aislados y estructuralmente elucidados tres nuevos diterpenoides *ent*-kauranos llamados xerophilusin L, M y N, junto con otros tres conocidos designados como rabdoterin A, longikaurin F y ponigidin (Li *et al.*, 2002). En 2004, también de hojas de la especie, fueron aislados e identificados dos diterpenoides del grupo de los *ent*-abietanos llamados xerophilusin R y S (Niu *et al.*, 2004).

En 2007 se aislaron 36 diterpenoides con estructura *ent*-kauranoide; 13 nuevos sin denominación común y 23 análogos conocidos, estos últimos llamados xerophilusin G, xerophilusin H, longikaurin B, longikaurin D, maoecystal I, rosthodin A, rabdoterin D, rabdoterin C, xerophilusin I, xerophilusin K, una mezcla de hebeirubescensins G y H, rabdoterin E, xerophilusin B, ponigidin, macrocalin B, xerophilusin A, xerophilusin D, xerophilusin N, trichorabdol B, phyllostachysin A, xerophilusin F y enanderinanin J (Li *et al.*, 2007). También fueron aislados e identificados dos nuevos *ent*-kauranoides llamados xerophinoids A and B (Weng *et al.*, 2007).

La construcción de una base de datos de diterpenoides fue iniciada en el año 1976 por el grupo dirigido por el Dr. Han-Dong Sun y más de 1000 *ent*-kauranoides puros han sido identificados a partir del género *Isodon* (Wang *et al.*, 2013b).

Sun *et al.* (2006), clasificaron los diterpenoides provenientes de *Isodon* en once grupos que incluyen cinco subgrupos, basados en su estructura química como se expone a continuación:

1. C-20 no-oxigenados *ent*-kauranos
2. C-20 oxigenados *ent*-kauranos
 - 2.1. Monoepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.1.1. 7,20-epoxi-*ent*-kauranos
 - 2.1.2. 3,20-epoxi-*ent*-kauranos
 - 2.1.3. 11,20-epoxi-*ent*-kauranos
 - 2.1.4. 14,20-epoxi-*ent*-kauranos
 - 2.1.5. 19,20-epoxi-*ent*-kauranos
 - 2.2. Diepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.2.1. 1,20:11,20-diepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.2.2. 7,20:14,20-diepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.2.3. 7,20:19,20-diepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.2.4. 3,20:7,20-diepoxi-*ent*-kauranos
 - 2.3. C-20 oxigenados no-epoxi-*ent*-kauranos
3. 6,7-seco-*ent*-kauranos
 - 3.1. Enmein (tipo 1,7-lactona)

- 3.2. Spiro-lactona (tipo 7,20-lactona)
4. 8,9-seco-*ent*-kauranos
5. 8,15-seco-*ent*-kauranos y 15,16-seco-*ent*-kauranos
6. 7,20-ciclo-*ent*-kauranos
7. *ent*-kauranos dímeros
8. *ent*-kauranos diversos
9. *ent*-giberilinas
10. Abietanos y *ent*-abietanos
11. Otros diterpenos tricíclicos y bicíclicos

De acuerdo a esta clasificación, xerophilusin A y xerophilusin B pertenecen a la categoría de 7,20:14,20-diepoxi-*ent*-kauranos, longikaurin B a la de 7,20-epoxi-*ent*-kauranos, y xerophilusin F es un 7,20-ciclo-*ent*-kaurano. Los 4 compuestos son motivo de estudio de esta tesis doctoral.

II.7.1.4. Propiedades farmacológicas

En un principio, los diterpenoides de *Isodon* atrajeron una considerable atención como agentes antibacterianos, antitumorales y antiinflamatorios (Sun *et al.*, 2006). Análisis fitoquímicos y farmacológicos demostraron que los diterpenos de especies del género *Isodon*, son un grupo de compuestos de los más biológicamente activos contra la inflamación y el cáncer (Bremner y Heinrich, 2002; Xu *et al.*, 2010). Weng *et al.* estudiaron más de 50 especies de *Isodon* distribuidas en China, encontrando alrededor de 500 diterpenoides. Entre ellos, los extraídos a partir de *I. xerophilus* mostraron ser los más efectivos contra células tumorales (Weng *et al.*, 2007).

Se demostró que un extracto en acetato de etilo de hojas de esta especie, inhibe potentemente el crecimiento *in vitro* de células tumorales incluyendo leucemia mieloide crónica (K562), leucemia promielocítica humana (HL-60) y adenocarcinoma de estómago (MKN-28). Y que los diterpenoides xerophilinoids A y B, aislados y estudiados contra líneas celulares tumorales y algunos mediadores inflamatorios, redujeron la producción de nitrito en macrófagos murinos RAW 264.7, inhibieron la producción de TNF- α y disminuyeron la producción de IL-1 β , así como también exhibieron potente citotoxicidad contra las líneas celulares tumorales K562, leucemia promielocítica aguda (NB4), leucemia promielocítica aguda en modelo insensible al ácido *trans*-retinoico (NB4-R2), carcinoma cervical (Me180), y contra la línea celular hematopoyética multipotencial murina (32D) (Weng *et al.*, 2007).

También los diterpenoides 7,20:14,20-diepoxi-*ent*-kauranos (xerophilusin A, B y macrocalin B), así como xerophilusin I, J y K, enanderianin y longikaurin B, obtenidos a partir de *I. xerophilus*, exhibieron significativo efecto inhibitorio sobre células tumorales humanas K562, HL-60 y MKN-28 (Hou *et al.*, 2000a; Hou *et al.*, 2001b).

Los 36 *ent*-kauranoides aislados e identificados por Li *et al.* en 2007 fueron evaluados en su actividad citotóxica frente a las líneas celulares K562, MKN45 y HepG2. Trece de ellos, tres nuevos sin denominación común (7 β ,11 β ,14 β -trihydroxy-*ent*-kaur-20-al-6,15-dioxo-16-eno; 6 β ,11 β ,14 β -trihydroxy-*ent*-kaur-20-al-7,15-dioxo-16-eno y 6 β ,7 β ,14 β -trihydroxy-11 β -acetoxo-16 α -methoxymethyl-7 α ,20-epoxy-*ent*-kaur-15-ona) y diez conocidos (longikaurin B, longikaurin D, maocrystal I, rosthorin A, xerophilusin K, rabdoternin E, xerophilusin B, ponigidin, xerophilusin A y xerophilusin N) demostraron significativa actividad citotóxica contra una o más líneas celulares (Li *et al.*, 2007).

Por otra parte, los 10 triterpenoides aislados de *I. xerophilus* e identificados como ácidos oleanólico, ursólico, maslínico, 2 α -hidroxiursólico, 3 β ,23-dihidroxiurs-12-en-28-oico, arjunólico, asiático, 2 α ,3 α ,24-trihidroxiolean-12-en-28-oico, 2 α ,3 α ,24-trihidroxiurs-12-en-28-oico, y hederagenina, y los tres *ent*-abietanos denominados xerophilusin XIV, XV y XVI, se ensayaron contra tres líneas celulares tumorales humanas, K562, MKN45 y HepG2 sin mostrar actividad citotóxica (Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012), lo cual confirma al grupo de los diterpenoides *ent*-kauranos como los responsables de la actividad.

Puesto que entre la actividad citotóxica manifestada por estos compuestos, hay dianas comunes con inflamación e inmunidad, muchos de estos estudios tienen aspectos comunes y potencialidad diversa. Estos resultados hacen suponer que esta clase de *ent*-kauranos podría ser un interesante grupo de productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer y la inflamación.

II.7.2. *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn.

Cayaponia tayuya (Vell.) Cogn. (Cucurbitaceae) fue originalmente nombrada como *Bryonia tayuya* Vell. Otras denominaciones para ésta última son *Arkezostis tayuya* (Vell.) Kuntze y *Trianosperma tayuya* (Vell.) Mart. Sinonimias de *C. tayuya* son *C. piauiensis* (Cogn.) Cogn. y *Trianosperma piauiensis* Cogn. (Tropicos®).

En Brasil es conocida como “tayuyá” y “taiuíá”, y en Perú es llamada “tayuya”. Otros nombres vulgares son “taioia”, “abobrinha-do-mato”, “anapinta”, “cabeça-de-negro” y “tomba”

(Taylor, 2003). En el sur y sureste de Brasil, con el nombre vulgar de “taiuiá” también son conocidas varias especies, no solo del género *Cayaponia* sino, particularmente, del género *Wilbrandia*. La especie oficial para la primera Farmacopea Brasileira (1929) de la droga vegetal “taiuiá” es *Cayaponia tayuya*, pero la droga más frecuentemente comercializada y consumida es *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. Las similitudes botánicas dificultan la identificación de estas especies que sólo es posible a través de la comparación de sus flores y frutos (Dos Santos *et al.*, 1996; Gonzalez y Di Stasi, 2002).

Gomes-Costa y Alves (2012) exponen en su trabajo tres claves taxonómicas que permiten identificar a *C. tayuya* cuando no se cuenta con la planta entera, a partir de sus hojas, o de sus flores masculinas, o de sus frutos.

II.7.2.1. Descripción botánica y distribución

C. tayuya es una enredadera leñosa, diclino monoica, que presenta una gran raíz tuberosa. El tallo mide hasta 1 cm de grosor, es flexible, de coloración verde oscuro en las partes jóvenes y marrón en las porciones viejas; el contorno es irregular, con surcos longitudinales poco profundos. Presenta hojas alternas, tri-, tetra- o pentalobadas, con los lóbulos laterales y central deltoides a lanceolados, de consistencia coriácea, de superficie áspera y margen denticulado; la cara superior del limbo es verde oscura, punteada, y la inferior verde clara, reticulada y pubescente; el lóbulo central es más largo, pudiendo el limbo alcanzar hasta 10 cm de ancho y 10 cm de largo. El pecíolo alcanza un largo de 3 cm y 4 mm de grosor, se presenta curvado y ligeramente retorcido; en la parte superior muestra un surco poco profundo y lateralmente está recorrido por 4 a 5 surcos longitudinales. En la unión del pecíolo con el limbo, en la cara inferior de la hoja, se encuentran glándulas secretoras que pueden aparecer en número variable; en promedio presentan 4 a 5 glándulas de cada lado. Los zarcillos están opuestos a las hojas y alcanzan en promedio 25 cm de longitud cuando están completamente distendidos; en la base pueden medir hasta 2 mm de grosor; presentan a 10 cm de la base aproximadamente, un divertículo enrollado de más o menos 6 cm de longitud; el enrollamiento es de izquierda a derecha, presentando en la parte media una porción recta, a partir de donde, hacia la parte distal, el enrollamiento es en sentido inverso. Las hojas se orientan hacia arriba por la curvatura del pecíolo; entre las hojas y los zarcillos, en los extremos de las ramas, se localizan los tallos de las inflorescencias. Las flores masculinas se agrupan en panículas y son de coloración verde claro; el pedúnculo floral puede adquirir hasta 3 mm de largo por 0.5 mm de grosor; las flores,

cuando están completamente desarrolladas, pueden llegar a los 2 cm de longitud; el cáliz está constituido por 5 piezas soldadas que alcanzan una misma altura formando una pieza cónica; alternando con las piezas de la corola, se observan pequeñas expansiones que constituyen los ápices de los sépalos; la corola está formada por 5 pétalos libres soldados al cáliz formando una pieza continua, campanulada; los pétalos alcanzan más o menos 1 cm de longitud y son glabros; después de la completa apertura de la corola, los ápices de los pétalos se curvan hacia adentro; los estambres en número de tres, unidos, se presentan ligados a una expansión que se forma en el tercio inferior del cáliz; los filamentos son cortos y libres; eventualmente se cuentan 4 filamentos; debajo de la unión de los filamentos con el cáliz se observa la formación de una cámara donde se localizan 3 a 4 nectarios, visibles a ojo desnudo; las anteras están soldadas y muestran externamente estrías y surcos sinuosos; la dehiscencia se lleva a cabo por incisiones longitudinales; el conjunto de las anteras puede alcanzar hasta 3 mm de longitud y los filamentos alcanzan más o menos la misma medida; presenta pistiloide mínimo, glanduliforme, trilobado. Las flores femeninas también están dispuestas en panículas; son de coloración verde y alcanzan en promedio 1.5 cm de longitud; cáliz y corola se unen formando un tubo; los sépalos, en número de 5, están unidos, presentándose al mismo nivel; los ápices de los sépalos se proyectan en los bordes del cáliz en pequeñas protuberancias que se alternan con los pétalos; éstos, en número de 5 son libres a partir del margen del cáliz; tienen forma lanceolada y pueden alcanzar hasta 8 mm de longitud; aparentemente, cáliz y corola son glabros; el estilo está coronado por un estigma globular que se sitúa en la unión de los pétalos con el cáliz. El fruto es una baya con pericarpio cartáceo, oblongo, de coloración roja cuando madura; alcanza hasta 12 mm de longitud por 9 mm de ancho; presenta un pedúnculo corto y en la parte distal muestra un pequeño punto oscuro; su superficie es lisa (**Figuras 16 y 17**). Las semillas, en general 3, son oblongas, de coloración marrón, ligeramente aplanadas y pubescentes; alcanzan en promedio 1.2 cm de longitud por 0.6 cm de ancho y 3 mm de espesor; la parte superior es redondeada y la inferior es estrecha, ligeramente retorcida, con una cavidad formando dos proyecciones desiguales; el embrión es pequeño y presenta cotiledones plano convexos; el endosperma es reducido. Presenta una raíz poco profunda, generalmente se desliza a pocos centímetros del suelo y puede alcanzar varios metros; posee coloración blanquecina y su superficie está recorrida por estrías longitudinales poco profundas; cuando está fresca es flexible y cuando está seca, muestra fractura fibrosa; es ligeramente tortuosa y con pocas ramificaciones secundarias. *C. tayuya* muestra gran polimorfismo, especialmente en las hojas y las bayas (De Candolle y De Candolle, 1881; Pinagé, 2011; Gomes-Costa y Alves, 2012).

Tiene un ciclo vegetativo anual y la floración de esta planta ocurre en los meses de septiembre y octubre (Pinagé, 2011).

Crece en los terrenos húmedos y sombríos de la selva amazónica, principalmente en Brasil, Colombia y Perú, así como Bolivia (Raintree, 2016). En Brasil, Grotta menciona la presencia de esta especie en los estados de Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Río de Janeiro, Bahía y Río Grande do Sul. (Pinagé, 2011).

La recolección de la raíz de esta planta sólo se puede hacer durante la temporada de lluvias, ya que retirar sus largas raíces de los suelos arcillosos de la Amazonía durante la estación seca es muy difícil (Raintree, 2016).

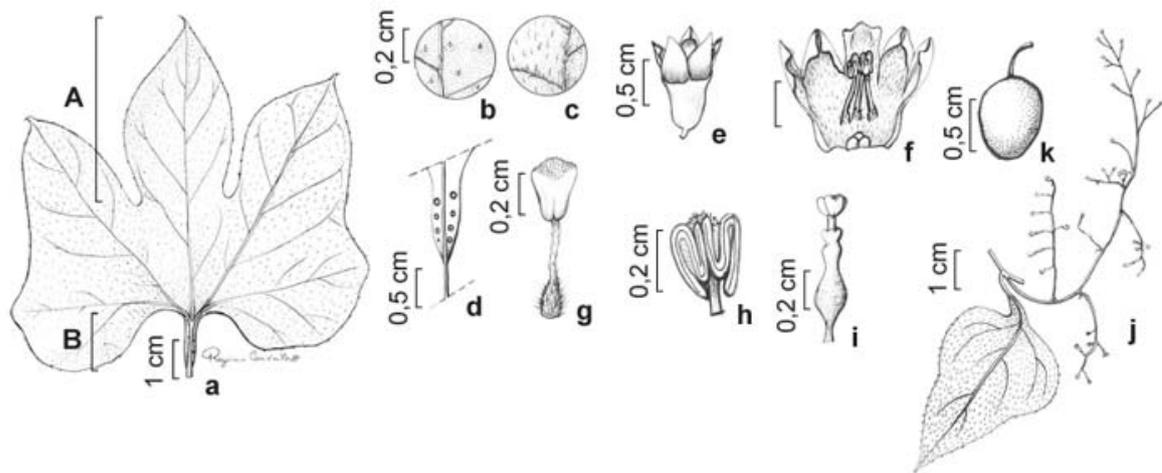


Figura 16. *Cayaponia tayuya*: a. hoja; b. detalle de la superficie superior de la hoja; c. detalle de la superficie inferior de la hoja; d. detalle de glándulas en la hoja; e. vista superficial de flor masculina; f. vista interna de flor masculina mostrando estambres y pistiloide trilobado; g. estambre, vista dorsal; h. antera, vista frontal; i. capullo de flor femenina, sin corola, mostrando estilo y stigma; j. inflorescencia con bractea; k. fruto, vista superficial. Tomada de <http://www.scielo.br/img/revistas/rod/v63n4/html/a07fig01.htm>



Figura 17. Especimen de herbario de *Cayaponia tayuya* obtenida de <http://www.tropicos.org/Image/100247845>

II.7.2.2. Uso en medicina tradicional y/o popular

Los pueblos originarios de América del Sur han usado la raíz de tayuya desde tiempos prehistóricos. Fue empleada tradicionalmente como tónico y depurador de la sangre y usada durante siglos para mordeduras de serpientes y reumatismo. Los aborígenes de Colombia empleaban esta planta para tratar ojos irritados y los de Perú para problemas de la piel (Taylor, 2003).

En la medicina popular de Brasil, Perú y Colombia es ampliamente usada como agente antiinflamatorio y antirreumático (Escandell *et al.*, 2006). Los nativos de América del Sur, refieren el uso de *C. tayuya* como efectiva para el tratamiento del asma, artritis, reuma, gota, estreñimiento y otros desordenes gastrointestinales (Bauer *et al.*, 1983). Tiene reputación de manifestar acción diurética, laxante y fuertemente analgésica y antiinflamatoria. Ha sido usada para el tratamiento de la lepra, sífilis, epilepsia, dermatosis, úlceras gástricas y reumatismo (Bauer *et al.*, 1985; Ríos *et al.*, 1990; Dos Santos *et al.*, 1996; Gonzalez y Di Stazi, 2002).

Las hojas tienen un efecto cicatrizante en úlceras gástricas y los frutos son efectivos en el tratamiento de sífilis y dermatosis (Ríos *et al.*, 1990).

En Brasil, “tayuya”, tiene una larga historia en medicina natural; las raíces de esta especie nativa son usadas en medicina tradicional brasilera para tratar afecciones diversas. Fue reconocida como droga vegetal oficial de la Brazilian Pharmacopoeia en el año 1926 (Gazola, 2008). Hoy es usada como diurética, laxante, analgésica, antiinflamatoria, tónica, purificadora de la sangre y desintoxicante; para el tratamiento de diarrea, epilepsia, problemas estomacales, fatiga y debilidad, sífilis y como antídoto contra mordeduras de serpientes (Truiti *et al.*, 2006). En la región de Alto Río Grande, Minas Gerais, Brasil, actualmente es usada la raíz de *C. tayuya*, preparada en decocción o infusión, como laxante, para tratar neuralgias, como antisifilítica, depurativa, antirreumática y en dermatosis (Rodrigues y Carvalho, 2001). Las comunidades de Apiúna, situada en las proximidades del Parque Nacional Serra do Itajaí, región del Bosque Atlántico, la utilizan como detoxificante, depurador, en trastornos estomacales e inflamación (Tribess *et al.*, 2015).

Actualmente, en América del Norte y del Sur, tayuya se emplea por sus propiedades analgésicas. Profesionales de la salud natural en los Estados Unidos están utilizando tayuya para tratar el síndrome del intestino irritable, dispepsia y digestión lenta, neuralgia, ciática, gota, dolores de cabeza, reumatismo, y como regulador metabólico. Debido a su eficacia reportada como un purificador de la sangre y desintoxicante, también se utiliza para tratar la retención de

líquidos, heridas, eczema, herpes, acné severo y otros problemas de la piel. También se utiliza en el entrenamiento deportivo y la recuperación, para ayudar a eliminar el ácido láctico acumulado tras la actividad física, reducir la inflamación y aliviar la fatiga emocional y la depresión (Taylor, 2003; Patel *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, la raíz es preparada en forma de infusión; una cucharadita de raíz pulverizada por cada taza de agua, vertiendo agua a punto de ebullición sobre la droga vegetal y dejando reposar 10 minutos. Luego de que el polvo haya sedimentado se bebe caliente. La dosis es de una taza, dos a tres veces al día. Como alternativa, 1 a 2 g de la raíz en polvo se mezclan con jugos, agua o comida, dos o tres veces diarias (Raintree, 2016).

Las hojas, aplicadas como cataplasma o compresas, son usadas para tratar úlceras y dolores diversos. Se emplea para esto, una cantidad de hojas equivalente a un pocillo de café cada medio litro de agua en ebullición, y se aplica en el sitio afectado 3 veces al día durante 10 a 15 minutos (Rodrigues y Carvalho, 2007).

II.7.2.3. Composición química

Los compuestos mayoritarios encontrados en raíces de *C. tayuya* pertenecen a los grupos fitoquímicos de los terpenoides: cucurbitacinas y cayaponósidos, y de los flavonoides (Bauer *et al.*, 1983, 1985; Gonzalez y Di Stazi, 2002). Himeno *et al.* (1992, 1994a) señalan la formación de espuma cuando las raíces son agitadas en agua, y la estimulación de la mucosa nasal por las raíces pulverizadas, lo cual indica también la presencia de saponinas. Además se mencionan alcaloides, resinas, aceites fijos, sustancias albuminoides y gomosas (Pinagé, 2011).

Las cucurbitacinas son compuestos amargos, químicamente con estructura de triterpenoides, encontrados en plantas de la familia Cucurbitaceae (Lavie y Szinai, 1958), aunque no exclusivas de ella. Están presentes en muchas otras familias de plantas, incluyendo Begoniaceae, Cercidiphyllaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontainiaceae, Elaeocarpaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Sterculiaceae, y Thymelaeaceae (Jayaprakasam *et al.*, 2003; Ríos *et al.*, 2005). Se estima que surgieron a través de un proceso evolutivo conducente a proteger a las especies vegetales del ataque de diversos predadores herbívoros invertebrados y vertebrados (Metcalf *et al.*, 1980). Según la especie, se las encuentran en distintos órganos como raíces o rizomas, frutos, semillas o partes aéreas (Ríos *et al.*, 2005).

Estos compuestos son terpenos tetracíclicos con estructura de 19(10→9β)-*abeo*-10α-lanost-5-eno (**Figura 18**), conocida comúnmente como esqueleto cucurbitano. De acuerdo a características estructurales, son divididas en 12 categorías. En general las cucurbitacinas se designan con letras correlativas (cucurbitacina A, cucurbitacina B, etc.). Otras veces el nombre evoca una modificación química (23, 24- dihidrocucurbitacina B) y en otros casos, el nombre proviene del género del que se aisló la cucurbitacina (cayaponósidos, aislados de alguna especie del género *Cayaponia*, fevicordinas a partir del género *Fevillea*). En las plantas están presentes como glicósidos o aglicones libres. El más común de esos compuestos libres es la cucurbitacina B (Ríos *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

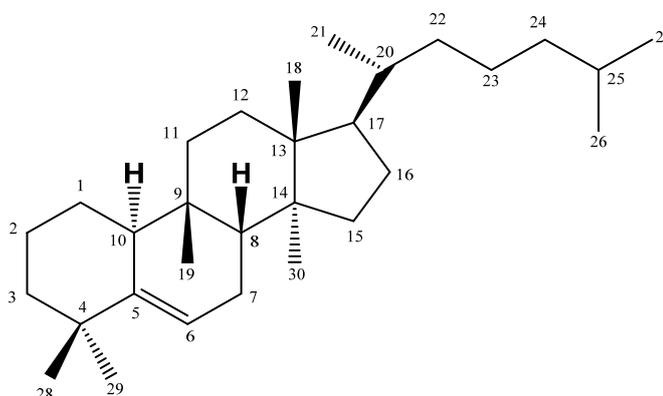


Figura 18. Estructura química del esqueleto cucurbitano.

En el trabajo de Bauer *et al.* (1983, 1985), se identificaron a partir de raíces de *C. tayuya* cucurbitacinas y C-glicosilflavonas. Los principales compuestos flavonoides fueron identificados como swertisin, spinosin, vicenin-2, vitexin, isovitexin, orientin e isoorientin, y las cucurbitacinas, como cucurbitacina R y su glucósido, 23,24-dihidrocucurbitacina B y su glucósido, 23,24-dihidroisocucurbitacina B, cucurbitacina B y su 2-O-glucosido. Mientras que Himeno *et al.* (1992) describieron la presencia de cuatro glucósidos de *nor*-cucurbitacinas con anillo A aromático como los compuestos mayoritarios hallados en un extracto en metanol de raíz de *C. tayuya* previamente extraída con cloroformo. Estos compuestos fueron llamados cayaponósidos A, B, C y D. Además, muchos otros cayaponósidos minoritarios fueron aislados a partir de la raíz de *C. tayuya* (Himeno *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, 1994c, Konoshima *et al.*, 1995).

Análisis fitoquímicos realizados con extractos de polaridades crecientes de raíz de *C. tayuya* demostraron que la fracción clorofórmica es rica en cucurbitacinas, mientras que las fracciones de acetato de etilo y butanol contienen principalmente C-glicosil flavonoides (Ríos *et al.*, 2005).

II.7.2.3.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales que se encuentran en todas las plantas superiores y en muchas de las inferiores (Swain, 1975). Está ampliamente aceptado que son una “invención” de las plantas terrestres, asumiendo que algas y cianobacterias son y eran “libres de flavonoides” aunque existen excepciones (Mouradov y Spangenberg, 2014). Están presentes en flores, frutos, semillas, hojas, tallos, cortezas y raíces; esta amplia distribución a través del reino vegetal, resulta en su inevitable presencia en dietas ricas en alimentos o bebidas derivadas de plantas, en las que parecen contribuir con beneficios generales sobre la salud. En la actualidad se considera que la ingesta en la dieta occidental media, contiene aproximadamente unos 50 mg de flavonoides diarios calculados como aglicones (Middleton, 1998; Middleton *et al.*, 2000; Beecher, 2003)

El papel de los flavonoides en las plantas consiste en combatir el estrés oxidativo; tienen la capacidad de absorber las longitudes de onda solares más energéticas (es decir, UV-B y UV-A), inhibiendo la generación de ROS, y suprimiendo ROS una vez que se han formado. Y también participan en la regulación del crecimiento, controlando el movimiento y catabolismo de auxina (Kumar y Pandey, 2013; Mouradov y Spangenberg, 2014).

Forman parte de la gran familia de los polifenoles, y fueron descubiertos por Albert Szentgyorgyi mientras trabajaba en el aislamiento de la vitamina C (Ribeiro *et al.*, 2015). Más de 10 000 flavonoides han sido identificados en más de 9000 especies vegetales, por lo que la ruta de síntesis de flavonoides, es una de las vías metabólicas más extendida en las plantas actuales (Mouradov y Spangenberg, 2014).

Estas moléculas tienen una gran diversidad estructural, pero derivan de una ruta biosintética común, la vía metabólica de fenilpropanoides, que incorpora precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la vía del acetato-malonato, la cual conduce a un intermediario con estructura chalcona. Este compuesto básico sirve como núcleo central para la obtención de todos los otros flavonoides, que se obtienen por medio de una ciclación posterior que genera el anillo γ -pirona; y se caracterizan por una estructura común de dos anillos aromáticos (A y B) unidos entre sí por 3 átomos de carbono y 1 átomo de oxígeno que forman el tercer anillo heterocíclico de 6 miembros (γ -pirona, C) como muestra la **Figura 19** (Gomes *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009).

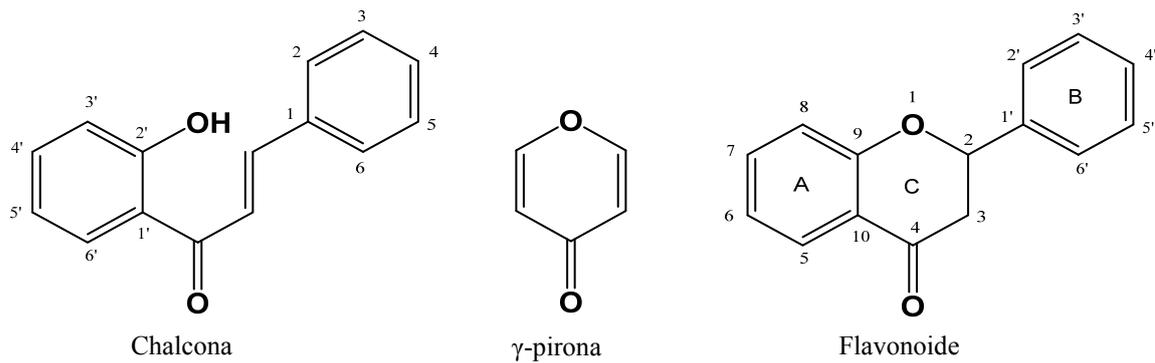


Figura 19. Estructuras químicas de esqueletos chalcona, γ -pirona y flavonoide.

Los flavonoides están divididos en subclases, basadas en la posición de unión del anillo B al C, y en la saturación, el estado de oxidación y grupos funcionales del anillo C. La clasificación más general los agrupa en flavanonas, flavanonoles, flavanoles, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas, y sus estructuras se muestran en la **Figura 20**. Dentro de cada subclase, los flavonoides individuales se identifican y se caracterizan por patrones de hidroxilación y de conjugación del esqueleto carbonado (Beecher, 2003; Kumar y Pandey, 2013).

Además, los flavonoides se presentan como aglicones, glicósidos y derivados metilados; es común que en el vegetal estén presentes las formas aglicón y glicosiladas del mismo flavonoide. La glicosilación por lo general, procede mediante la unión de un sustituyente azúcar a un grupo hidroxilo, durante la síntesis del flavonoide en la planta; generando un *O*-glicosilflavonoide, reacción que ofrece la preservación del oxígeno del hidroxilo en el enlace glicosídico. La *O*-glicosilación ocurre más frecuentemente en los grupos hidroxilos de los C₇, C₃, C₄ y menos frecuentemente en otras posiciones; siendo los carbohidratos más habituales ramnosa, glucosa, gluco-ramnosa, galactosa y arabinosa. También es común encontrar derivados *C*-glicosilados. En la última década muchos *C*-glicosilflavonoides fueron aislados e identificados a partir de una amplia variedad de especies vegetales. Los *C*-glicosilflavonoides se caracterizan y diferencian de los anteriores por la presencia de un enlace covalente C-C entre el núcleo flavonoide y el carbono anomérico del resto azúcar, generalmente monómeros de glucosa y galactosa; y los enlaces covalentes ocurren usualmente en las posiciones de los C₆ y C₈ (Courts y Williamson, 2013; Kumar y Pandey, 2013).

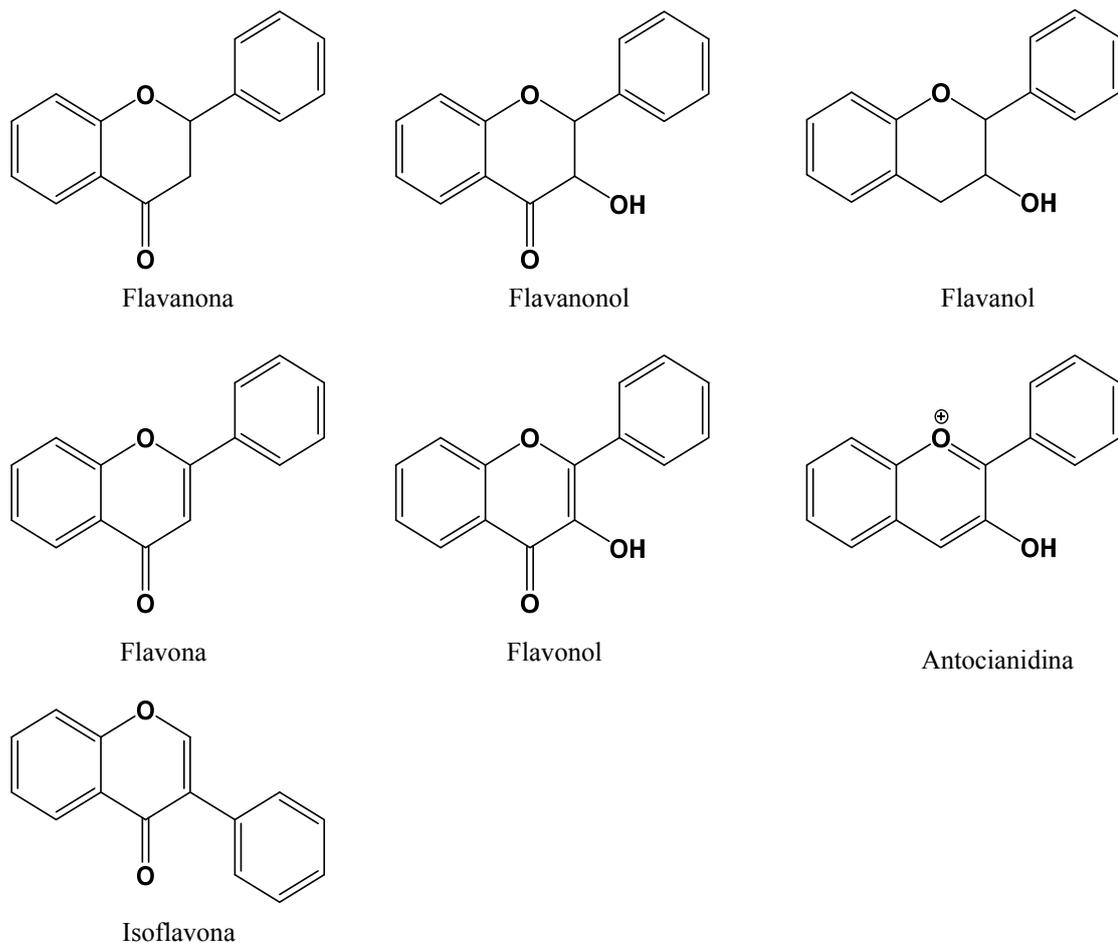


Figura 20. Estructura de los núcleos químicos de las subclases de flavonoides.

Los *C*-glicosilflavonoides han sido clasificados en 4 grupos principales: mono-*C*-glicosilflavonoides, di-*C*-glicosilflavonoides, *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides y *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides. Dentro del grupo de *C*-glicosilflavonoides, debido a sus diferencias estructurales y biogénicas, las *C*-glicosilflavonas son consideradas como una familia excepcional, siendo las más abundantes en la naturaleza (Talhi y Silva, 2012).

La adición de un resto de azúcar en la estructura aglicón es capaz de alterar su biodisponibilidad después del consumo oral, debido a la modulación de parámetros fisicoquímicos críticos, tales como la polaridad estructural. Además, el enlace *C*-glicosídico es resistente a los mecanismos hidrolíticos que fácilmente rompen enlaces *O*-glicosídicos, lo que conduce a diferencias fundamentales en el análisis, degradación, farmacocinética y bioactividad de los flavonoides *C*-glicosilados (Ferreira da Costa, 2015; Courts y Williamson, 2013; Zeng *et al.*, 2013).

Los flavonoides son antioxidantes naturales y poseen una amplia gama de actividades biológicas. Varios de ellos han mostrado efectos inhibidores en diferentes modelos experimentales de inflamación (Huguet *et al.*, 1990).

II.7.2.4. Actividad farmacológica

Diferentes especies de la familia Cucurbitaceae fueron estudiadas como agentes antiinflamatorios y antitumorales, demostrando que los efectos farmacológicos se deben principalmente al contenido de cucurbitacinas. Muchas plantas de esta familia usadas en la medicina folklórica para el tratamiento de artritis y reumatismo, contienen cucurbitacina B. En el año 1988 se presentó el primer informe que demostró la potente actividad antiinflamatoria de este compuesto (Yesilada *et al.*, 1988). También fevicordin A (una *nor*-cucurbitacina) y su glucósido, mostraron actividad antiinflamatoria similar a cortisona, en un ensayo de edema en pata de rata inducido por carragenina, aún administrados a bajas dosis (Achenbach *et al.*, 1993).

La mayoría de las publicaciones sobre actividades farmacológicas de *C. tayuya* corresponden a los efectos que ejercen compuestos puros aislados de esta planta medicinal, pertenecientes a las ya mencionadas cucurbitacinas y cayaponósidos.

Konoshima *et al.* (1995) informaron sobre un significativo efecto inhibitorio de la activación del virus Epstein-Barr inducido por el promotor tumoral TPA (un modelo utilizado para la investigación de potenciales agentes antitumorales), ejercido por los cayaponósidos B, B₃, D, D_{3b} y C₂ aislados a partir de raíces de *C. tayuya*; y sobre la inhibición de la promoción tumoral en un modelo *in vivo* de papiloma en piel de ratón, ejercida por los cayaponósidos B y C₂.

23, 24-dihidrocucurbitacina B y cucurbitacina R, también aisladas de *C. tayuya* mostraron actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiartrítica en modelos *in vitro* e *in vivo*, debido a sus habilidades para inhibir la expresión de TNF- α en linfocitos y macrófagos, y para interferir con la actividad del factor nuclear NF-AT (Recio *et al.*, 2004; Escandell *et al.*, 2006, 2007a, 2007b, 2010; Ríos, 2010).

Cucurbitacina B tiene actividad antiproliferativa contra muchos tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, páncreas, hígado, cerebro, hueso, piel, cabeza y cuello, y leucemia. En un modelo ortotópico de cáncer de mama humano, redujo el tamaño del tumor en un 50%, sin toxicidades significativas. Por otra parte, en combinación con agentes quimioterapéuticos

en cáncer de páncreas, piel, y cabeza y cuello manifestó actividad antitumoral aditiva sin aumento de la toxicidad (Aribi *et al.*, 2013).

Ríos y colaboradores proporcionaron una recopilación de los estudios publicados en el período 1995-2005 sobre los efectos farmacológicos de las cucurbitacinas, centrándose principalmente en sus propiedades antiinflamatorias y anticancerosas (Ríos *et al.*, 2005).

Otra revisión tuvo como objetivo destacar algunos de los estudios sobresalientes y descubrimientos que han colocado visiblemente a las cucurbitacinas como potenciales agentes para el desarrollo de fármacos antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales (Bernard y Olayinka, 2010).

La revisión de Alghasham (2013), se concentró en las fuentes naturales a partir de las cuales se aislaron varias cucurbitacinas, sus estructura químicas y derivados, propiedades físicas, actividades biológicas y mecanismo por el cual ellas reducen la proliferación de células de cáncer humanas.

El estudio realizado por Ríos *et al.* (1990), además de evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de un extracto en cloroformo de raíces de *C. tayuya*, compuesto principalmente por cucurbitacinas, es pionero en poner atención sobre la actividad antiflogística de otras fracciones obtenidas con solventes más polares, constituídas por flavonoides. Los resultados mostraron que, administrados por vía intraperitoneal, el extracto rico en cucurbitacinas exhibió muy fuerte acción antiinflamatoria pero también resultó muy tóxico; mientras que el extracto rico en flavonoides *C*-glicosilados mostró una actividad menos potente pero con muy baja toxicidad. En el mismo trabajo se obtuvieron dos *C*-glicosilflavonas: vicenin-2 y spinosin que también resultaron efectivos por vía intraperitoneal.

La búsqueda en Google Académico con las palabras "*C*-glycosyl flavonoid" y "activity" arroja 329 resultados. Destacan entre ellos, las investigaciones que evalúan el efecto antioxidante (Xiao *et al.*, 2015), anticancer (Lai *et al.*, 2011), hepatoprotector (El-Toumy *et al.*, 2011), hipoglucemiante (Patel y Mishra, 2011), antinociceptivo (Xiao *et al.*, 2016), antiinflamatorio (Peluso *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013), antiviral (Cao *et al.*, 2013) y gastroprotector (Montanha *et al.*, 2008) de distintos integrantes de este grupo de compuestos.

Sin embargo, son pocos los trabajos que evalúan el efecto antiinflamatorio de alguno de los *C*-glicosilflavonoides hallados en *C. tayuya* por Bauer *et al.* y Ríos *et al.* (vicenin-2, spinosin, swertisin, vitexin, isovitexin, orientin e isoorientin). Entre ellos, cabe mencionar las investigaciones de Lin *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Sridhar *et al.*, 2006; Zucolotto *et al.*,

2009; Shie *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010; Marrassini *et al.*, 2011 y Choi *et al.*, 2014. La relación entre las particularidades evaluadas en estas publicaciones y el tema correspondiente de esta tesis será expuesta oportunamente en la sección de Discusión.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes planteados contemplamos las siguientes hipótesis:

Los pobladores de Yunnan emplean *Isodon xerophilus* para tratar diversas dolencias inflamatorias, entre otros usos. Estudios fitoquímicos y de citotoxicidad revelaron la presencia de compuestos *ent*-kauranos que manifiestan importante actividad citotóxica en células cancerígenas, lo cual los señala como potenciales agentes antitumorales. Teniendo en cuenta que las vías de señalización de inflamación y cáncer están relacionadas, suponemos que los *ent*-kauranos aislados de *I. xerophilus* modifican *in vitro* la expresión y actividad de diferentes mediadores proinflamatorios.

Cayaponia tayuya es usada en medicina tradicional de América del Sur, entre otras, por sus propiedades antiinflamatorias. Estudios farmacológicos demostraron que las cucurbitacinas y los cayaponósidos son responsables de tal actividad, y los análisis fitoquímicos revelan la presencia de otro grupo importante de metabolitos secundarios: los flavonoides, grupo extenso con muchos miembros con comprobada actividad antiinflamatoria. Suponemos que los flavonoides presentes en *C. tayuya* también contribuyen al efecto antiflogístico de esta planta medicinal.

A partir de las justificaciones y consideraciones expuestas hasta ahora, se propone un plan de trabajo dirigido hacia los siguientes objetivos generales y específicos:

III.1. Objetivos generales

Encontrar una justificación científica a la eficacia manifestada por la población local de Yunnan sobre el uso tradicional de *Isodon xerophilus* como antiinflamatorio y establecer la actividad *in vitro* de los principales compuestos activos de la especie.

Evaluar la contribución de los flavonoides de las raíces de *Cayaponia tayuya* al efecto antiinflamatorio. Estos compuestos forman parte de la composición química junto a los triterpenoides, principios cuya actividad fue previamente establecida.

III.2. Objetivos específicos

A. Para *Isodon xerophilus*

1. Examinar el efecto de metabolitos purificados a partir de hojas de *I. xerophilus*, sobre la liberación de mediadores proinflamatorios en cultivos celulares de macrófagos.
2. Observar las consecuencias del tratamiento de macrófagos con tales metabolitos sobre la expresión de las enzimas relacionadas con el proceso inflamatorio.
3. Estudiar los efectos de los metabolitos en cuestión sobre eventos que involucran al factor de transcripción NF- κ B, vinculado a inflamación.

B. Para *Cayaponia tayuya*

1. Fraccionar un extracto butanólico obtenido a partir de las raíces de *C. tayuya* e identificar sus componentes principales.
2. Evaluar el efecto de la administración tópica de la fracción enriquecida en flavonoides (FEF) en modelos de inflamación aguda y crónica.
3. Determinar la producción de mediadores de inflamación en cultivos celulares de macrófagos tratados con la FEF.
4. Examinar el efecto sobre la expresión de enzimas claves del proceso inflamatorio, producido por el tratamiento con la FEF sobre cultivos celulares de macrófagos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Compuestos estudiados

4.1.1. *ent*-kauranos purificados a partir de *Isodon xerophilus*

Los *ent*-kauranos estudiados en esta tesis (xerophilusin A, xerophilusin B, longikaurin B y xerophilusin F) fueron obtenidos previamente por el grupo dirigido por el Prof. Dr. Han Dong Sun, como se describe a continuación.

Las hojas de *I. xerophilus* fueron colectadas en la prefectura de Yuanyang de la provincia de Yunnan, en noviembre de 1998 y secadas al aire. La identidad del material vegetal fue verificada por el profesor Zhong-Wen Lin y una muestra (KIB 98-11-25 Lin) fue depositada en el Herbario del Departamento de Taxonomía del Instituto Kunming de Botánica, de la Academia China de Ciencias.

Para la preparación de los extractos se pulverizaron 8.3 kg de hojas secas que fueron maceradas en acetona 70%; el extracto, después de filtrado fue concentrado, extraído con acetato de etilo y llevado a sequedad, rindiendo 660 g. Una porción de ese extracto (440 g) fue sometida a cromatografía en columna de silicagel utilizando como fase móvil un sistema de gradiente de cloroformo: acetona (0:1 a 1:0) de la cual se obtuvieron siete fracciones (I a VII).

La fracción III se sometió a cromatografías sucesivas en columnas de silicagel eluida con éter de petróleo: acetona (8:2) y de RP-18 eluida con metanol: agua (2:3) dando lugar a la obtención de los compuestos xerophilusin A (900 mg) y xerophilusin B (340 mg) (Hou *et al.*, 2000a).

La fracción V fue sometida a repetidas cromatografías en columnas de silicagel (éter de petróleo: alcohol isopropílico = 9:1), de MCI gel CHP 20P (metanol: agua = 9:1) y de RP-18 (metanol: agua = 8:2), rindiendo el compuesto xerophilusin F (482 mg) (Hou *et al.*, 2000b; 2001a).

Finalmente, longikaurin B (260 mg) fue obtenido a partir de la fracción VII, habiendo sido sometida a cromatografía en columna de silicagel y recristalización (Hou *et al.*, 2001b).

Los aislamientos de xerophilusin A, xerophilusin B y xerophilusin F fueron novedosos, mientras que longikaurin B había sido aislado previamente a partir de hojas de *Rabdosia longituba* (Takeda *et al.*, 1988).

IV.1.2. Fracción de *Cayaponia tayuya* enriquecida en flavonoides

La fracción enriquecida en flavonoides (FEF) ensayada en esta tesis se obtuvo por fraccionamiento de un extracto butanólico, obtenido previamente por el grupo de investigación dirigido por el Prof. Dr. Ríos Cañavate, el cual había mostrado actividad antiinflamatoria (Ríos *et al.*, 1990).

Las raíces de *C. tayuya* fueron colectadas en Brasil en 1984 e identificadas por el Dr. Wickman (Svenska Örtemedicinska Institutet, Göteborg, Sweden). Una muestra (DF-88-01) fue depositada en el Herbario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España (Recio *et al.*, 2004).

Las raíces, luego de secadas y pulverizadas (100 g) fueron extraídas exhaustivamente con cloroformo. El marco, una vez seco, fue posteriormente extraído con metanol. El extracto metanólico fue llevado a sequedad en evaporador rotatorio (29 g), resuspendido en agua y extraído sucesivamente con cloroformo, acetato de etilo y butanol. Cada uno de estos extractos fueron llevados a sequedad y el rendimiento del extracto butanólico resultó en 4 g (Ríos *et al.*, 1990).

Para la obtención de la FEF, 2 g del extracto butanólico se disolvieron en metanol y se mezclaron con 4 g de silicagel 60 (0.2-0.5 mm). La mezcla se secó en evaporador rotatorio y se depositó en una columna de vidrio (Afora, Spain) rellena con 100 g silicagel (0.063-0.200 mm, 60 × 3.5 cm). La columna se eluyó con mezclas de polaridad creciente de acetato de etilo y metanol (90%, 80% y 50%), y metanol 100%, obteniendo 600 fracciones de 20 ml cada una. Cada fracción fue evaluada mediante cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que poseían características cromatográficas análogas; para ello se usaron placas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany), eluidas con acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:27) y observadas a la luz visible y UV-365 nm, habiendo sido reveladas previamente, mediante pulverización con NP-PEG (Reactivo de Productos Naturales: difenilborinato de aminoetilo 1% en metanol / Polietilenglicol-4000 5% en etanol; Wagner y

Bladt, 1996). Las fracciones 85 a 108, eluidas con acetato de etilo-metanol (90:10) y reunidas por similitud cromatográfica constituyeron la FEF, la cual fue llevada a sequedad en evaporador rotatorio.

IV.1.2.1. Identificación de los componentes

Para evaluar la composición de la FEF, se emplearon diversas técnicas como: cromatografía en capa fina (CCF, o TLC del inglés *Thin Layer Chromatography*), cromatografía líquida en vacío (CLV, o VLC del inglés *Vacuum Liquid Chromatography*), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, o HPLC del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) y resonancia magnética nuclear (RMN, o NMR de *Nuclear magnetic resonance* en inglés).

Cromatografía en capa fina

La CCF es una técnica analítica rápida y sencilla. Entre otras cosas, es de gran utilidad para la determinación de la composición de un extracto y es un buen método para establecer las fases estacionarias y fases móviles más apropiadas para el posterior fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna. También es utilizada como criterio de identidad de componentes por comparación de los valores de Rf (de *Ratio of Front* en inglés), relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa, con los de patrones o datos bibliográficos, ya que tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (Yueqin, 2007). El desarrollo de adsorbentes estandarizados comercialmente fue responsable de que la CCF se convirtiera en una técnica analítica reproducible (Machado, 2000).

Una de las fases estacionarias (FE) más ampliamente utilizadas es el gel de sílice o silicagel (SiO_2), es de carácter polar y se utiliza para separar sustancias polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). Entre la FE y el soluto ocurre un proceso de adsorción mediado por interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno. La poliamida es una FE utilizada para la separación de compuestos polihidroxilados, que interacciona a través de enlaces de hidrógeno con las sustancias a separar (Marcano y Hasegawa, 2002). El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. La fase móvil (FM) o eluyente puede ser un disolvente único o una mezcla de solventes miscibles de distinta polaridad. El orden de

elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la FM en un sistema de fase normal. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error" (Sherma, 2006; Santiago y Strobel, 2013). La placa cromatográfica, una vez desarrollada, se seca por corriente de aire caliente para eliminar los restos de fase móvil y se procede a su revelado.

Se utilizaron dos sistemas cromatográficos: placas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck), eluidas con acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:27) y placas de poliamida con indicador de fluorescencia a 254 nm (Sigma-Aldrich, USA.) eluidas con metanol: agua (2:1). Las placas fueron sembradas de manera puntual con la FEF previamente disuelta en metanol, y desarrolladas. En ambos casos el revelado se efectuó con el reactivo NP-PEG, revelador de compuestos fenólicos: las placas se pulverizaron, secaron y a continuación fueron observadas a la luz visible y a luz UV a 365 nm.

Cromatografía líquida de alta resolución

La técnica HPLC analítica es utilizada de forma rutinaria para la separación, cuantificación e identificación de compuestos químicos. En el caso de los equipos más sencillos, que no ofrecen la posibilidad de obtener un espectro (NMR, UV, IR o de masas) de los compuestos separados, el t_r (tiempo de retención) del analito es la única información cualitativa que ofrece el cromatograma, el cual solo puede ser usado como criterio de identidad ajustando las condiciones cromatográficas utilizadas a las declaradas en la bibliografía consultada para la comparación.

Se utilizó una columna LiChrospher RP-18 (5 μ m, 125-4; Merck) eluida con CH₃CN-H₂O-HAcO (18:82:1) a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Se inyectaron 10 μ l de la FEF (1 mg/ml) en un cromatógrafo Perkin Elmer serie 3 equipado con un Detector Espectrofotométrico LC-55 B (Perkin Elmer, USA) y la detección se realizó a 340 nm.

Cromatografía líquida en vacío

La VLC es una técnica cromatográfica útil para la separación de mezclas de productos naturales; es eficiente, rápida, económica y no requiere el uso de equipos sofisticados. El aparato consiste en un embudo de vidrio Büchner provisto de un disco fritado, acoplado a un Kitasato, una manguera conectada en un extremo a la salida lateral del Kitasato y en el otro a una trompa de agua que genera vacío a través del flujo de agua provisto por una canilla, a

la cual se conecta la trompa. La FE elegida es colocada en el Büchner y compactada primero mediante ligeros golpeteos y luego mediante el pasaje de una porción de FM con aplicación de vacío. Encima es colocada la muestra previamente disuelta e impregnada en una pequeña cantidad de FE, de modo que resulte en una fina capa. Sobre ella se coloca una capa de 0.5 cm de espesor de arena y sobre ella un disco de papel de filtro. Para el desarrollo de la columna se vierte una pequeña cantidad de FM sobre el papel de filtro y se aplica vacío. La fracción recogida en el Kitasato es trasvasada a un vial y rotulada. Se repite la operación hasta que hayan eluido todos los compuestos (Pelletier *et al.*, 1986).

La FE elegida fue MN-polyamide SC 6 (<0.07 mm; Macherey-Nagel, Germany); se compactó resultando en una columna de 3 cm de espesor. Se utilizó un embudo Büchner de 5 cm de altura y 4.3 cm de diámetro interno. Se sembraron 20 mg de la FEF. La FM consistió en mezclas de MeOH: H₂O (1:2; 1:1; 2:1) y MeOH puro, adicionada en porciones de 10 ml.

Resonancia magnética nuclear

La NMR es una de las técnicas espectroscópicas empleada habitualmente en la elucidación estructural de moléculas que resulta más eficiente y útil. Se fundamenta en el comportamiento que presentan los núcleos atómicos que poseen spin nuclear distinto de cero, en presencia de un campo magnético externo. Los núcleos más utilizados son los de ¹H y ¹³C ya que la abundancia natural es del 99% y 1.1% respectivamente. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona valiosa información acerca de la estructura del compuesto que lo origina (Web 2, 2016).

10 mg de distintas fracciones resultantes de la VLC fueron disueltos en 750 µl de dimetilsulfóxido deuterado, (DMSO-*d*₆ 99.9%, Sigma-Aldrich) y colocados en tubos de NMR (Dr. Glaser AB, Switzerland) de 5 mm. Los espectros de ¹³C NMR fueron obtenidos

en el Espectrómetro Varian Unity 400 MHz (Varian, USA) del Servicio de Espectroscopia de la Universidad de Valencia, España.

IV.2. Ensayos *in vivo*

IV.2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron grupos de cinco ratones hembras albinas de la raza Swiss de 25-30 g de peso y 8 semanas de edad, proporcionados por la compañía Harlan Interfauna Iberica S.L. (Barcelona, España). Los ratones, una vez recibidos se crían y mantienen bajo condiciones estandarizadas: temperatura de 22 ± 3 °C, fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12 h y alimentados con una dieta *ad libitum* estándar. Las condiciones de vivienda y todos los experimentos *in vivo* fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional de la Universidad de Valencia (España), de conformidad con las directrices establecidas por la Unión Europea sobre Protección de los Animales (CEE Council 86/609).

IV.2.2. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA

Se siguió la técnica descrita por Young y De Young (1989) utilizando ratones hembras de la cepa Swiss. El edema se indujo mediante la aplicación tópica de 2 µg/oreja de TPA (Sigma-Aldrich) disueltos en 20 µl de acetona (Panreac, Spain), aplicando con una micropipeta, 10 µl sobre la superficie externa y 10 µl sobre la superficie interna de la oreja derecha del ratón; el edema es máximo a las 4 h luego de la aplicación del TPA. La FEF (0.5 mg/oreja) se disolvió en 20 µl de acetona y se aplicó tópicamente, a razón de 10 µl sobre cada una de las superficies de la oreja derecha. Se utilizó indometacina (0.5 mg/oreja, Sigma-Aldrich) como fármaco de referencia disuelta en 20 µl de acetona, y se aplicaron 10 µl sobre cada superficie de la oreja derecha del ratón.

Se utilizaron 3 grupos de 5 ratones cada uno. Las orejas izquierdas de todos los grupos, utilizadas como blanco, solo recibieron 20 µl de acetona, 10 µl sobre cada superficie. En el grupo control, las orejas derechas fueron tratadas solo con TPA; para el grupo referencia, las orejas derechas fueron tratadas primero con TPA e inmediatamente después con indometacina; finalmente, las orejas derechas del grupo problema fueron tratadas con TPA e

inmediatamente después con la FEF. Después de 4 h, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se cortaron las orejas izquierda y derecha, se tomaron secciones circulares de cada una con ayuda de un sacabocados y se pesaron. El edema se determina por diferencia de peso entre las secciones de la oreja derecha y la izquierda. La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la expresión matemática:

$$\%I = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

siendo: ΔP_c la media aritmética del incremento de peso de las orejas del grupo control y ΔP_p la media aritmética del incremento de peso de las orejas del grupo problema.

IV.2.3. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicaciones múltiples de TPA

Se siguió el método propuesto por Stanley *et al.* (1991) que se basa en la administración repetida de TPA como agente irritante. El método, considerado un modelo que mimetiza procesos crónicos o subcrónicos de inflamación cutánea, tiene la ventaja de que el compuesto objeto de estudio se aplica cuando el proceso inflamatorio está establecido, lo que ocurre en la realidad terapéutica, es decir que evalúa su actividad como curativo (Stanley *et al.*, 1991). El ensayo se desarrolla durante 11 días y se trabaja con 4 grupos de 5 ratones cada uno: blanco, control, referencia y problema.

En el grupo problema, la inflamación fue inducida por aplicación tópica de 2 μ g de TPA por oreja, disueltos en 20 μ l de acetona, aplicando 10 μ l sobre cada superficie (interna y externa) de las dos orejas de cada ratón con la ayuda de una micropipeta, durante los días 1, 3, 5, 8 y 10 del ensayo a horario fijo (10 a.m). La FEF (0.5 mg/oreja, disueltos en 20 μ l de acetona) se administró a razón de 10 μ l sobre cada superficie (interna y externa) de las dos orejas de cada animal durante los días 8, 9 y 10 dos veces al día, una a las 10 a.m. (inmediatamente después de la aplicación de TPA para los días 8 y 10) y una segunda dosis 6 h más tarde (4 p.m.). El día 11 del ensayo, los animales solo recibieron la dosis de las 10 a.m. de la FEF y 6 horas más tarde se mataron por dislocación cervical.

Para el grupo de referencia se siguió el mismo esquema, aplicando en lugar del extracto enriquecido en flavonoides, una solución de dexametasona (0.025 mg/oreja) sólo una vez al

día (10 a.m.). En el grupo control, el esquema se redujo a las aplicaciones de TPA y de 10 μ l de acetona en los tiempos correspondientes a las aplicaciones de tratamiento con extracto. El grupo blanco sólo recibió el volumen correspondiente de acetona a cada tiempo indicado para TPA y/o tratamiento.

Después de sacrificados, se cortaron ambas orejas de cada animal, se obtuvieron secciones circulares con un sacabocados y se determinó el edema por diferencia de peso con respecto al grupo blanco. La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la siguiente expresión matemática:

$$\%I = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

siendo ΔP_c = media de pesos de las orejas tratadas con TPA – media de pesos de las orejas tratadas con acetona, ΔP_p = media de pesos de las orejas tratadas con la FEF – media de pesos de las orejas tratadas con acetona.

IV.3. Ensayos *in vitro*

IV.3.1. Macrófagos murinos RAW 264.7

Los macrófagos son el tipo principal de células que participan en el proceso de la inflamación mediante la producción de citocinas como TNF- α y diversos mediadores de la inflamación tales como el óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (Kwon *et al.*, 2013).

La línea celular RAW 264.7 se estableció a partir de un tumor inducido por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia murina Abelson. Son macrófagos obtenidos del líquido ascítico de ratones (*Mus musculus*) machos adultos BALB/c (web 1, 2012). Estas células fueron proporcionadas por la Unidad de cultivos del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia y proceden de la Colección Europea de Cultivos Celulares (*European Collection of Authenticated Cell Cultures* en inglés, ECACC, RU).

El medio base utilizado para el cultivo de estas células fue DMEM (de *Dulbecco's Modified Eagle's medium* en inglés) GlutaMAX™ 1 g/l glucosa (Gibco® Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS del inglés *Fetal Bovine Serum*,

Gibco®) a una concentración final del 10% y con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). La atmósfera del incubador Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific, USA) constituida por 95% de aire y 5% de CO₂ y la temperatura mantenida a 37.0 °C. Las células eran crecidas hasta alcanzar subconfluencia y luego utilizadas para los ensayos y/o subcultivadas.

Protocolo

Los subcultivos se hacen cada 2 ó 3 días en frascos de 75 cm². Para esto, se aspira el medio y se lavan las células con PBS (de *Phosphate Buffered Saline* en inglés), se añaden 10 ml de medio fresco y las células (que crecen adheridas a superficie) se desprenden con ayuda de un “scraper” y se homogenizan. Luego se distribuyen a razón de 1:3 en frascos nuevos a los cuales se adicionan 20 ml de medio fresco. La composición del PBS consiste en Na₂HPO₄ 1.420 g, KH₂PO₄ 0.408 g, NaCl 8.010 g y H₂O c.s.p. 1000 ml; pH = 7.27, 4 °C.

Para los ensayos, las células ya desprendidas y homogenizadas, según el párrafo anterior, se cuentan en un contador Coulter Counter® (Beckman Coulter Life Sciences, USA) y se siembran según el protocolo de cada ensayo.

IV.3.2. Ensayo de viabilidad celular. Citotoxicidad

Este ensayo se lleva a cabo a fin de determinar el rango de concentraciones permitidas de los productos a evaluar en los distintos protocolos experimentales.

El efecto citotóxico de los productos sobre los distintos tipos celulares se mide usando el ensayo del 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) (Mossman, 1983), que se basa en la conversión del MTT de color amarillo a formazán de color azul. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células viables. Esta reacción está catalizada por succinato deshidrogenasas mitocondriales. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Arrebola *et al.*, 2003).

Siguiendo el protocolo experimental, se siembran 200 μl de una suspensión de 2×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se incuban durante 24 h a 37.0°C . Luego se reemplaza el medio por 195 μl de DMEM con 0.5% de FBS y las células se tratan con 5 μl de la muestra a distintas concentraciones finales (Cf) durante 24 h. Luego, una vez eliminado el xenobiótico, se añade a cada pocillo 100 μl de MTT (Cf: 0.5 mg/ml, Sigma-Aldrich). Se incuba la placa a 37.0°C hasta la aparición de color azul (30-60 min), al menos en los controles. El medio se elimina y se añaden 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo que disuelve los cristales de formazán. Se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan[®] EX (Thermo Fisher Scientific).

El cálculo de viabilidad celular se realiza mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

donde: Am es la media aritmética de la absorbancia de la muestra y Ac la media aritmética de la absorbancia del control (células sin tratamiento).

Los 4 *ent*-kauranos estudiados en esta tesis, xerophilusin A, xerophilusin B, longikaurin B y xerophilusin F se evaluaron siguiendo el protocolo indicado más arriba, cada uno de ellos a las siguientes Cf: 0.10, 5.00, 10.00, 25.00 y 50.00 μM .

La FEF fue evaluada según el protocolo señalado antes, seleccionando las siguientes Cf para ser ensayadas: 5.0, 20.0, 40.0 y 60.0 $\mu\text{g/ml}$.

IV.3.3. Determinación de NO

El NO es un radical libre gaseoso que actúa por difusión. Cumple roles esenciales en el mantenimiento de la homeostasis, por ejemplo en el mantenimiento del tono de los vasos sanguíneos y proporcionando funciones de neurotransmisión y neuromodulación. Pero, por otro lado, la generación de NO en exceso y/o mantenida, a menudo desencadena condiciones patológicas, en particular, enfermedades relacionadas con inflamación (Murakami y Ohigashi, 2007), por este motivo, la importancia de su determinación en la evaluación de compuestos con potencial antiinflamatorio. La cuantificación de NO es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 s) y a sus bajas concentraciones, por eso

se cuantifica su metabolito estable, el nitrito, resultante de la autooxidación del NO en disoluciones acuosas (Adarmes *et al.*, 2009).

Basado en el método descrito por De León *et al.* (2003). Se prepara una curva patrón de nitrito de sodio (NaNO₂) para poder interpolar las absorbancias que se obtengan en los ensayos con los productos, y conocer su concentración. Se preparan concentraciones decrecientes de NaNO₂ desde 80.0 mM hasta 2.5 mM. Se añaden 100 µl de cada disolución por pocillo y 100 µl del reactivo de Griess (naftiletilendiamina al 0.1% en H₂O y sulfanilamida al 1% en H₃PO₄), por duplicado. La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, dando una sal de diazonio, seguida de un acoplamiento con aminas bicíclicas tal como el *N*-1-(naftil)etilendiamina dihidrocloruro, que presenta un máximo de absorbancia a 540 nm.

Se siembran 2×10^5 células/200 µl por pocillo, en una placa de 96 pocillos y se dejan incubar 24 h hasta subconfluencia. Se elimina el medio y se añaden 175 µl de DMEM con 0.5% de FBS (195 µl para las células blanco). Se añaden 5 µl de los productos objetos de estudio a las Cf elegidas para ser ensayadas, o vehículo (control y blanco: DMSO al 1%), y se deja incubar a 37.0 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 h. La producción de NO se estimula (control y tratamientos) mediante la adición de 20 µl de LPS (Sigma-Aldrich; Cf: 1 µg/ml). A las 24 h se toman alícuotas de 100 µl del sobrenadante y se disponen en otra placa de 96 pocillos, añadiendo 100 µl del reactivo de Griess (Sigma-Aldrich). Se mide la absorbancia en el lector de placas a 540 nm. Estos valores se interpolan en la recta de calibración para obtener los valores de producción de nitritos.

Las Cf de los *ent*-kauranos seleccionadas para ser ensayadas fueron 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 y 5.00 µM siguiendo el protocolo descrito más arriba.

Las Cf de la FEF escogidas para ser probadas fueron 12.0, 23.0 y 35.0 µg/ml.

IV.3.4. Determinación de la producción de TNF- α

El TNF- α es uno de los mediadores proinflamatorios reconocidos más importantes; esta citocina es producida principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infecciones virales o bacterianas (Vargas Salazar, 2009).

La determinación de los niveles de citocinas en fluidos biológicos, como plasma, suero y sobrenadante de cultivos celulares, e hidrolizados celulares y de tejidos, se realiza mediante inmunoensayos enzimáticos específicos con la ayuda de diferentes tipos de kits de ELISA (de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* en inglés). El tipo de ELISA llamado "sándwich", es una prueba simple y sensible. El ensayo se realiza en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con el anticuerpo primario anti-citocina que se quiera determinar, donde diluciones seriadas de la muestra con concentraciones desconocidas de citocinas, son añadidas en los pocillos. Luego, la citocina que se quiere determinar y que se ha asociado al primer anticuerpo, que es específico para la citocina en cuestión, se asocia a través de él con un segundo anticuerpo detector que está conjugado con biotina. Seguidamente se añade estreptavidina-HRP (estreptavidina conjugada con la enzima HRP, de *horseradish peroxidase* en inglés); la estreptavidina forma complejos de alta afinidad con biotina. Posteriormente, se introduce un sustrato cromogénico reactivo con HRP, lo cual genera un producto coloreado en proporción a la cantidad de citocina presente (TNF- α en nuestro caso), que se puede determinar espectrofotométricamente. Los valores de absorbancia medidos se interpolan en una curva de calibración hecha con TNF- α estándar para obtener las concentraciones de cada muestra.

El protocolo experimental consiste en sembrar 1×10^5 células/200 μ l por pocillo, en una placa de 96 pocillos e incubar 24 h hasta subconfluencia. Eliminar el medio y añadir 175 μ l de DMEM con 0.5% de FBS (195 μ l para las células blanco). Añadir 5 μ l de la FEF a 23.0 y 35.0 μ g/ml (Cf), o vehículo (control y blanco: DMSO al 1%), e incubar a 37.0 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 h. Estimular las células (control y tratamientos) mediante la adición de 20 μ l de LPS (Cf: 1 μ g/ml) e incubar 24 h. Luego determinar la producción de NO usando el reactivo de Griess como control de activación celular. Y la producción de TNF- α se determina a partir del sobrenadante celular con ayuda de un kit de ELISA específico (eBioscience, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.3.5. Determinación de la inducción de iNOS y COX-2 por Western blot

La técnica denominada Western blot consiste en la separación de proteínas a partir de una mezcla compleja en un gel de poliacrilamida por electroforesis (PAGE, de *Polyacrylamide*

Gel Electrophoresis en inglés), la transferencia desde el gel de las proteínas separadas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, de *polyvinylidene difluoride* en inglés), la identificación de la proteína en cuestión mediante anticuerpos primarios específicos, la detección mediante anticuerpos secundarios conjugados con alguna actividad enzimática y finalmente, la cuantificación por densitometría de dicha proteína.

Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación mediante la aplicación de un campo eléctrico de partículas cargadas. Los primeros soportes empleados en los procesos de electroforesis fueron el papel (acetato de celulosa, Whatman 3MM, etc.), más tarde se desarrollaron estructuras en tres dimensiones en forma de geles. Los primeros geles utilizados fueron los de almidón, que mejoraron la resolución con respecto al papel, pero no permitían controlar las dimensiones del poro. Así pues, se desarrolló el tipo de gel más utilizado en las electroforesis de proteínas, que es el gel de acrilamida. El proceso de electroforesis es discontinuo, este tipo de electroforesis se caracteriza por la utilización de dos tipos de geles: un gel de separación, en el que el porcentaje de acrilamida (hasta un 30%) se elige en función de la proteína o proteínas que se desea separar (a mayor concentración, menor tamaño de poro) y un gel de concentración o “stacking”, en el que se polimerizan los pocillos destinados a contener las muestras, en este caso el porcentaje de acrilamida es considerablemente inferior, alrededor del 4%. Esta disposición permite que una aplicación de muestra en un pocillo del orden de 1 cm se comprima y llegue a la interfase con una dimensión de 1 mm. De este modo, las condiciones de partida de todas las partículas son las mismas, ya que en cualquier proceso de separación es necesario e imprescindible que todas las partículas comiencen dicho proceso a la vez y en el mismo punto, dado que el resultado que se obtenga de una separación por electroforesis se determina por la movilidad electroforética de las partículas, condicionada por su tamaño y carga. Puesto que se trabaja con tampones que tienen diferentes pH y las proteínas ven afectada su carga en función de este parámetro, en principio el efecto que tendría el pH en la carga de las proteínas de una mezcla compleja de macromoléculas sería desconocido. Por esta razón, la mayoría de las electroforesis actuales se realizan en condiciones desnaturizantes, como SDS-PAGE (SDS de *Sodium Dodecyl Sulfate* en inglés). Este tipo de electroforesis se basa en la desnaturización de las proteínas. Para ello se utiliza el denominado tampón de muestra o “sample buffer” (SB) que contiene

SDS, 2-mercaptoetanol, glicerol, y azul de bromofenol. El SDS es una sal sódica, un detergente de carga negativa. Este compuesto es capaz de unirse a las proteínas y conferirles carga negativa debido a que «enmascara» la propia carga de las proteínas. La unión del SDS con las proteínas se produce en una proporción constante, es decir, cada gramo de proteína es capaz de unirse a 1.4 g de SDS. La relación carga/masa de la proteína, por lo tanto, va a ser constante para todas las proteínas de una mezcla compleja, de este modo, la separación ocurre solo en función del tamaño de la partícula. El 2-mercaptoetanol reduce cualquier puente disulfuro de la proteína, que pierde su estructura secundaria y terciaria, permitiendo que el SDS recubra la molécula uniformemente; también suele usarse DTT (*dithiothreitol* en inglés). El glicerol aumenta la densidad y asegura que la muestra tenga en el pocillo una densidad superior que la del electrolito y la muestra permanezca estable. El azul de bromofenol tiene una movilidad electroforética superior a la de las proteínas que se tienen en la muestra, de este modo, se utiliza como marcador del frente de electroforesis que, en principio, garantiza que por detrás se encuentren las proteínas e indica cuándo se debe interrumpir la electroforesis.

Transferencia

La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de PVDF es cuantitativa e irreversible. Existen dos tipos de sistemas de transferencias, la semiseca y la húmeda o en tanque, que es especialmente recomendable para proteínas difíciles de transferir (> 100 kDa o hidrófugas). Las membranas más utilizadas actualmente son las de PVDF que tienen la ventaja frente a otras (nitrocelulosa o nailon) de una alta capacidad para unir biomoléculas, además de que son más manejables y permiten una amplia gama de tinciones reversibles y métodos de detección.

Bloqueo

Las membranas con el material transferido se bloquean para impedir uniones inespecíficas del anticuerpo que se utiliza en la técnica. Este proceso se realiza mediante la incubación de la membrana en una disolución de bloqueo, compuesta, por lo general, por proteínas que no reaccionan después con el anticuerpo. Para las membranas de PVDF se suele utilizar como disolvente para la disolución de bloqueo tampón de lavado PBS-Tween 20 (disolución

tampón fosfato suplementada con Tween 20). Para el bloqueo se puede usar leche desnatada deshidratada al 5%.

Anticuerpos

Las proteínas inmovilizadas en la membrana, se incuban con anticuerpos primarios específicos que permiten identificar y cuantificar proteínas concretas, de una mezcla compleja de proteínas. En la actualidad se usan fundamentalmente dos tipos de preparaciones de anticuerpos, los policlonales, cuyas preparaciones incluyen múltiples moléculas de anticuerpo que se unen a un antígeno concreto, y anticuerpos monoclonales, que poseen la ventaja de que son específicos en sus interacciones porque únicamente se unen a un epítipo en particular, es decir a una única región del antígeno.

Detección

Para detectar las uniones antígeno-anticuerpo en una inmunotransferencia, existe un método práctico consistente en la utilización de anticuerpos secundarios con una actividad enzimática.

Estos anticuerpos se unen específicamente a las regiones de los anticuerpos primarios que no se unen a los antígenos. Las actividades enzimáticas que se suelen utilizar conjugadas con anticuerpos secundarios son la fosfatasa alcalina (AP, de *Alkaline Phosphatase* en inglés) y la peroxidasa del rábano picante “horseradish”, ya que permiten la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante sustratos luminiscentes. Este método es muy útil, porque permite conseguir una mayor sensibilidad variando el tiempo de exposición de la película autorradiográfica y porque el resultado obtenido puede ser fácilmente fotografiado o digitalizado, lo cual permite cuantificación por densitometría (de la Fuente González *et al.*, 2007).

Protocolo

a) Tratamiento celular

- ***ent-kauranos***

Se siembran 1.5 ml de suspensión conteniendo 1×10^6 células RAW264.7 en una placa de cultivo de 6 pocillos y se incuban 24 h hasta subconfluencia. Se elimina el medio y se añaden 875 μ l de DMEM con 0.5% de FBS (975 μ l para las células blanco). A las 3 h se añaden 25

µl de los compuestos de ensayo (Cf: 5.0, 1.0, y 0.1 µM), dexametasona (Cf: 5 µM), o vehículo (medio DMEM con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0.5% de FBS, y ≤ 2% DMSO), y se deja incubar a 37.0 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 h. Las células (control y tratamientos) se estimulan mediante la adición de 100 µl de LPS (Cf: 1 µg/ml) y se incuban a 37.0 °C durante 24 h para luego proceder a la lisis celular.

- **Extracto de *C. tayuya* enriquecido en flavonoides**

Se procede como en el párrafo anterior, donde a las tres horas después de haber hecho el cambio de medio de cultivo, se añaden 25 µl de la FEF a las Cf de 23.0 y 35.0 µg/ml.

b) Lisis celular

Las células se lavan dos veces con PBS a 4 °C, se desprenden utilizando un “scraper” con 200 µl de tampón de lisis a 4 °C, se colocan en un eppendorff y se sonicán por un ciclo de 10 s con el ultrasonificador Sonifer® S-150 (Branson, USA), se centrifugan a 20800 ×g durante 10 min a 4 °C en una centrífuga 5810 R (Eppendorf, Spain) y se reserva el sobrenadante para cuantificar proteína y realizar el Western blot.

El tampón de lisis utilizado en la obtención de los lisados celulares consiste en: 1% Triton X-100, 1% ácido desoxicólico, 20 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, y un comprimido de un cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA: cOmplete™ Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Alemania), cada 10 ml de tampón.

c) Cuantificación de proteínas

Después de la centrifugación, las proteínas presentes en las muestras se cuantifican con el método de Bradford (Sigma-Aldrich). Se realiza una dilución del sobrenadante 1/10 en agua millipore, 10 µl se colocan por duplicado en una placa de 96 pocillos, se adicionan 250 µl del reactivo de Bradford, se incuban durante 15 min y se mide la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolan en una recta estándar de albúmina sérica bovina (BSA de *Bovine Serum Albumin* en inglés, Gibco™) para obtener las concentraciones de proteína de las muestras. Conociendo estas concentraciones, se calcula el volumen a tomar que contenga 30 µg de proteína para sembrar en cada pocillo del gel “stacking”.

d) Western blot

Una vez tomados los volúmenes de las muestras conteniendo los 30 μg de proteína, se les adiciona tampón de muestra Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Scientific, USA) en relación 5:1 (v/v), se agitan en un Vortex Genius3 (IKA[®], Germany) y se hierven durante 5 min. Así las muestras quedan listas para ser sembradas en el gel. Las muestras se cargan en el gel y se inicia la electroforesis a 200 V y corriente constante.

El equipo de electroforesis utilizado: Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Spain). La composición del tampón de electroforesis 10x: Tris base 30.2 g, Glicina 143.5 g, SDS 10.0 g y agua cantidad suficiente para 1000 ml. La composición del gel “stacking”: 1.30 ml acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v, 1.45 ml Tris base 1M pH 6.8, 7.25 ml agua, 100 μl SDS 20%, 50 μl persulfato amónico 10% y 5 μl TEMED. La composición del gel separador: 9.00 ml acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v, 3.38 ml Tris base 3M pH 8.7, 14.7 ml agua, 150 μl SDS 20%, 75 μl persulfato amónico 10 % y 7.5 μl TEMED; resultando en un gel al 10% de poliacrilamida con un tamaño de poro indicado para la separación de proteínas de 10 a 100 kDa (Lomonte, 2007). La separación lleva aproximadamente 90 min.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron por el método húmedo a una membrana PVDF Hybond-P (GE Healthcare, Spain) durante 90 min a 250 mA, voltaje constante y 4 °C. Antes de armar el sándwich de transferencia, la membrana de PVDF se activa sumergiéndola 10 s en metanol (Scharlau, Spain), luego 5 min en agua y finalmente en el tampón de transferencia hasta su utilización. De este modo, la membrana, altamente hidrofóbica, se hace compatible con sistemas acuosos. Para el armado del sándwich, gel y membrana se ponen en contacto, se cubren ambos con papel Whatman[®] 3MM (Sigma-Aldrich) y luego con esponjas, este sistema es colocado entre cátodo y ánodo, cuidando que la membrana quede orientada hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo. La composición del tampón de transferencia 10x: Tris base 30.2 g, Glicina 143.5 g y agua cantidad suficiente para 1000 ml. Adicionar 20% de metanol al realizar la dilución 1x.

Finalizada la transferencia, la membrana se bloquea durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave en un agitador orbital Stuart[™] Scientific Giro-Rocker STR 9 (Sigma-Aldrich) con leche desgrasada al 6% (p/v) en PBS-Tween 20 [PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% (v/v); Tween 20, Sigma-Aldrich]. Concluido el bloqueo, la membrana se incuba

con el anticuerpo policlonal primario correspondiente a la proteína que se quiera determinar diluido en leche desgrasada al 3% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lava tres veces la membrana con PBS-Tween 20 durante 10 min con agitación suave para eliminar anticuerpos no unidos a proteína. Luego del lavado se incuba con inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:12000 en leche desgrasada al 5% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se repite el lavado como se describió previamente y se procede a detectar la proteína de interés por medio de una reacción quimioluminiscente. Para ello se cubre la membrana con una disolución conteniendo peróxido de hidrógeno y luminol Immobilon™ Western HRP Chemiluminescent Substrate (Millipore, USA) durante 5 min. La peroxidasa del rábano picante, conjugada al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del luminol por el peróxido de hidrógeno, como resultado, se origina una especie molecular reactiva, de estado electrónico excitado, que al relajarse emite luz. La cantidad de luz emitida (densidad óptica por unidad de área), proporcional a la cantidad de proteína de interés, se detecta con el equipo de captura digital de imágenes LAS 3000 mini (Fujifilm, Japan). La cuantificación de iNOS se realiza mediante el programa Multi Gauge v2.0 (Fujifilm) normalizando los valores obtenidos respecto a β -actina, proteína utilizada como control de carga, ya que su expresión no cambia frente a la aplicación de distintos tratamientos, y expresando estos valores como porcentaje respecto al control.

Para las muestras en las que se evalúa el efecto de los *ent*-kauranos se utilizan anticuerpo primario de conejo anti-iNOS diluido 1:2000 (Cayman Chemical, USA) y anticuerpo primario de conejo anti- β -actina diluido 1:10000 (Sigma-Aldrich).

Para las muestras en las que se evalúa el efecto de la FEF se utilizan además de los dos anteriores, anticuerpo primario de conejo anti-COX-2 diluido 1:2000 (Cayman Chemical).

IV.3.6. Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de Polimerasa de iNOS

La RT-PCR (de *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* en inglés) es la combinación de dos técnicas que permite a partir de RNAm extraído de una célula, sintetizar DNA complementario (DNAc) que se amplifica por una reacción en cadena de la polimerasa

(Rappolee *et al.*, 1988). Para la reacción de obtención del DNAC se necesita un cebador, se utiliza un oligo(dT)₁₅ que hibrida con la secuencia de poli(A) presente en el extremo 3' del RNAm eucariota; desoxinucleótidos trifosfato (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la enzima transcriptasa inversa. Para la reacción de amplificación se necesitan cebadores sentido y antisentido del gen que se desea amplificar, dNTP y la enzima polimerasa.

La técnica PCR se basa en la repetición de un proceso de tres pasos: desnaturalización del DNAC, hibridación de los cebadores y síntesis de la nueva cadena.

Desnaturalización

El DNAC está compuesto por dos cadenas de polinucleótidos asociadas por puentes de hidrógeno formados entre pares de bases complementarias. La desnaturalización implica un calentamiento a 95 °C que rompe los puentes de hidrógeno dando como resultado dos cadenas simples de DNA.

Hibridación

Los cebadores o “primers” son cadenas simples cortas de DNA que definen los límites de la secuencia del DNAC que se desea amplificar y son necesarios para iniciar la actividad de la DNAPolimerasa. Reduciendo la temperatura entre 50 y 60 °C los cebadores se unen con alta especificidad a sus bases complementarias en las cadenas simples de DNA.

Síntesis

A partir del cebador hibridado, la *Tth* DNAPolimerasa sintetiza la nueva cadena de DNA adicionando bases de nucleótidos complementarios a la cadena simple de DNA; esto se logra aumentando la temperatura a 72 °C. El resultado es la síntesis de dos moléculas de DNA de doble cadena idénticas al DNAC inicial. Las DNAPolimerasas utilizadas deben resistir las altas temperaturas de trabajo, deben ser termoestables; la *Tth* DNAPolimerasa es obtenida a partir de *Thermus thermophilus*, una bacteria adaptada a vivir a altas temperaturas.

El proceso de tres pasos se repite unas 30 veces y en cada ciclo, de una molécula de DNAC se obtienen dos, es decir que al final de cada ciclo el DNAC se habrá amplificado 2ⁿ veces, donde *n* es el número de ciclos (Gibbs, 1990; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La amplificación del DNAC se lleva a cabo en termocicladores automáticos que permiten fijar las temperaturas y los tiempos de cada paso del proceso de amplificación y el

número de ciclos. Los DNAC amplificados se detectan mediante electroforesis en gel de agarosa.

Protocolo

a) Tratamiento celular

Se siembran 5 ml de una suspensión conteniendo 5×10^6 células RAW 264.7 en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Se incuban a 37.0°C durante 24 h. Se reemplaza el medio por 4375 μl de DMEM con FBS al 0.5% (4875 μl para las células blanco). Se incuba a 37.0°C durante 3 h. Se adicionan 125 μl de los compuestos de ensayo (Cf: 5.0 μM) o vehículo (células blanco y control) y se incuban a 37.0°C durante 1 h. Las células (control y tratamientos) se estimulan mediante la adición de 500 μl de LPS (Cf: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incuban a 37.0°C durante 8 h. Las células se lavan dos veces con PBS a 4°C , se desprenden con 1 ml de PBS a 4°C con ayuda de un “scraper” y se colocan en eppendorf de 1.5 ml libres de RNasas, se centrifugan 15 s a máximas revoluciones y se aspira el sobrenadante. Se procede a la extracción del RNA total del “pellet”.

b) Extracción de RNAm

La extracción del RNA total se llevó a cabo utilizando el RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen, Germany) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Esta técnica permite la purificación del RNA, combinando las propiedades de unión selectiva de una membrana de sílica contenida en mini columnas, con la adecuada velocidad de centrifugación. Los “pellet” se lisan con 350 μl del tampón de lisis RLT adicionado con 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de 2-mercaptoetanol y se adicionan 350 μl de etanol que proporciona la condición adecuada para la unión del RNA a la membrana. Las muestras se colocan en las mini columnas que se adaptan a tubos de recolección y se centrifugan a $8000 \times g$ durante 20 s. El primer lavado se realiza adicionando a cada columna 700 μl de tampón RW 1 y centrifugando a $8000 \times g$ durante 20 s. El segundo lavado se realiza adicionando a cada columna 500 μl de tampón RPE y centrifugando a $8000 \times g$ durante 20 s. El tercer lavado se realiza adicionando a cada columna 500 μl de tampón RPE y centrifugando a $8000 \times g$ durante 2 min. Las mini columnas se adaptan a tubos de recolección nuevos, el RNA total se eluye por adición 30 μl de agua libre de RNasas y centrifugación a $8000 \times g$ durante 1 min. Los tubos de recolección se colocan en baño de hielo y se procede a la cuantificación del RNA por medida de sus absorbancias a 260 y 280 nm en

un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10 Bio (Thermo Scientific, USA), efectuando previamente una dilución de 1:200. Las disoluciones puras de RNA tienen un valor de relación A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.0 y la concentración expresada en $\mu\text{g/ml}$ se calcula mediante la fórmula:

$$C = A_{260} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

c) Obtención del DNAc de iNOS

Para la obtención del DNAc se coloca en eppendorfs de 0.2 ml, libres de RNAsas, un volumen de RNA total equivalente a 1 μg y se adiciona 1 μl del cebador oligo(dT)₁₅ (Promega, USA). La mezcla se coloca en el termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) a 65 °C durante 5 min para favorecer la hibridación del oligo(dT)₁₅ con la cola poli(A) del RNAm. A cada eppendorf se adicionan 8 μl del tampón AMV-RT 5X (transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar), 5 μl de dNTPs, 1 μl de AMV-RT, 0.5 μl de RNasin (inhibidor de ribonucleasa, enzima que cataliza la hidrólisis de RNA), (todos los reactivos de Promega); el volumen se lleva a 40 μl con agua libre de RNAsas. Los eppendorf se colocan en el termociclador a 42 °C durante 20 min. Finalizada la síntesis de DNAc los eppendorf se colocan en baño de hielo.

d) Amplificación del DNAc de iNOS

Para la amplificación de DNAc resultante se utiliza el kit Biotools DNA Polymerase Format Gel (Biotools, Spain). Cada vial contiene un gel que incluye la *Tth* DNAPolimerasa (Cf: 1 U), el tampón de reacción [Cf: 75 mM Tris HCl (pH 9), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)SO₄] y dNTPs (Cf: 200 μM de cada uno). Se añaden 20 μl de agua bidestilada estéril para resuspender el gel, 2 μl de cada uno de los cebadores (sentido: 5'CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3') y (antisentido: 5'GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3') de iNOS (Cf: 0.5 μM de cada uno), 2.5 μl del DNAc y se completa el volumen a 50 μl con agua bidestilada estéril. Se repite el esquema reemplazando los cebadores de iNOS por cebadores de β -actina (sentido: 5'-GCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3') y (antisentido: 5'-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3') utilizada para normalizar los resultados de iNOS. Se homogenizan las muestras, se llevan al termociclador y se programa a 94 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial; 28 ciclos a 94 °C durante un minuto para las fases de

desnaturalización, a 60 °C durante un minuto para la fase de hibridación y a 72 °C durante un minuto para la fase de extensión; y a 72 °C durante 10 min para la extensión final.

e) Electroforesis en gel de agarosa

Los DNAc amplificados se someten a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en TBE 0.5x, suplementado con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). A cada vial conteniendo los 50 µl de DNAc amplificado, se adicionan 10 µl de tampón de carga y se siembran 10 µl en cada pocillo del gel. La electroforesis se lleva a cabo durante 20 min a 70 V usando TBE 1x como tampón de desarrollo. Las bandas se visualizan con radiación UV (260 nm) en el equipo de captura digital de imágenes LAS 3000 mini (Fujifilm. Tokyo, Japan). La cuantificación de los DNAc de iNOS se realiza mediante el programa Multi Gauge v2.0 (Fujifilm) normalizando los valores obtenidos respecto a β-actina.

El tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) 5x consiste en: 54.0 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5M y agua c.s.p. 1000 ml. Ajustar el pH 8.3.

La composición del tampón de carga: 0.4 g de glucosa, 2.5 mg de azul de bromofenol y agua millipore c.s.p 1 ml.

IV.3.7. Determinación de la cinética de degradación de IκB por Western blot

Siguiendo el protocolo experimental se siembran en una placa de cultivo de seis pocillos, 1.5 ml de suspensión conteniendo 1×10^6 células RAW264.7 y se incuban 24 h hasta subconfluencia. Se elimina el medio y se añaden 875 µl de DMEM con 0.5% de FBS (975 µl para las células blanco). A las 3 h se añaden 25 µl de los compuestos de ensayo (Cf: 5.0 µM) a las células tratamientos, o vehículo (medio DMEM con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0.5% de FBS, y $\leq 2\%$ DMSO) a las células blanco y control, y se deja incubar a 37.0 °C en una atmósfera del 5% en CO₂ durante 1h. Las células (tratamiento y control) se estimulan mediante la adición de 100 µl de LPS (Cf: 1 µg/ml) y se incuban a 37.0 °C durante 0, 10, 30 y 60 min para luego proceder a la lisis celular.

Para la lisis celular, cuantificación de proteína y Western blot se procede como se indicó en el ensayo de inducción de iNOS hasta el bloqueo de la membrana. Concluido el bloqueo, la membrana se incuba con anticuerpo policlonal de ratón anti-IκB diluido 1:500 en

leche desgrasada al 3% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lava tres veces la membrana con PBS-Tween 20 durante 10 min con agitación suave para eliminar anticuerpos no unidos a proteína. Luego del lavado se incuba con inmunoglobulina G de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa “horseradish” en una dilución 1:12000 en leche desgrasada al 5% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se repite el lavado como se describió previamente y se procede a detectar la proteína de interés por medio de la reacción quimioluminiscente como se describió en el mismo ensayo de determinación de inducción de iNOS.

IV.3.8. Determinación de la cinética de translocación de p65 por Western blot

Para el tratamiento celular se procede como se indicó en la determinación de la cinética de degradación de I κ B para luego proceder a la lisis y extracción de proteína nuclear.

Después del estímulo con LPS, a los tiempos correspondientes (0, 10, 30 y 60 min), las células se lavan dos veces con PBS a 4 °C, se desprenden utilizando un “scraper” con 1.5 ml de tampón de lisis A a 4 °C, el lisado se coloca en un eppendorff, se incuba en hielo por 10 min y luego se centrifuga a 2150×g durante 5 min a 4 °C. El “pellet” se resuspende en 200 μ l en tampón B a 4 °C, se incuba y centrifuga como se describió antes (el sobrenadante constituye la fracción de proteína citosólica). El “pellet” se resuspende en 50 μ l de tampón C y se incuba en hielo durante 5 min. Se adicionan 5 μ l de NaCl 5 M y se incuba en hielo durante 30 min con agitación. La mezcla se centrifuga a 20800 ×g durante 15 min a 4 °C y se reserva el sobrenadante para cuantificar proteína nuclear y realizar el Western blot.

El tampón A está compuesto por HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 15 mM, MgCl 2 mM y EDTA 0.1 mM pH 8.0. La composición del tampón B es como la del A más el agregado de NP-40 al 0.2%. El tampón C está compuesto por HEPES 25 mM pH 7.9, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0, glicerol 10% y por cada 10 ml de solución se adiciona un comprimido del cóctel inhibidor de proteasas.

Para la cuantificación de proteína y Western blot se procede como se indicó en el ensayo de inducción de iNOS hasta el bloqueo de la membrana. Concluido el bloqueo, la membrana se incuba con anticuerpo policlonal de conejo anti-p65 diluido 1:500 en leche

desgrasada al 3% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lava tres veces la membrana con PBS-Tween 20 durante 10 min con agitación suave para eliminar anticuerpos no unidos a proteína. También se detecta PARP-1 (de *poly(ADP-ribose) polymerase 1* en inglés), utilizada como control de carga, ya que su expresión no se ve afectada por los diferentes tratamientos. Para esto, la membrana se incubaba con anticuerpo policlonal primario de conejo anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:400 como se describió antes. Luego del lavado se incubaba con inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante en una dilución 1:12000 en leche desgrasada al 5% (p/v) en PBS-Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se repite el lavado como se describió previamente y se procede a detectar las proteínas de interés por medio de la reacción quimioluminiscente.

IV.3.9. Localización de p65 por inmunocitoquímica

La técnica inmunocitoquímica se basa en el reconocimiento *in situ* de una molécula (antígeno) presente en una célula, por un anticuerpo que previamente se ha conjugado con un fluorocromo, una enzima, o un coloide de un metal pesado como por ejemplo el oro.

Los anticuerpos, conjugados con estos compuestos, reconocen en la célula los componentes antigénicos contra los cuales fueron desarrollados y ponen de manifiesto su localización mediante una señal obtenida a través de instrumental especializado (microscopio de fluorescencia, microscopio confocal, citómetro de flujo). Si se emplea, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, el marcador será un fluorocromo, el cual emite fluorescencia al ser excitado por la luz ultravioleta; si la unión antígeno-anticuerpo se evidencia mediante una enzima se hace necesario el empleo del sustrato de la misma, además de una sustancia que reaccione con él y que proporcione un color determinado o un precipitado que pueda ser distinguido en un microscopio óptico de campo brillante o con una técnica adecuada al microscopio electrónico. Es un método poderoso que posibilita evaluar la presencia y la localización celular de la molécula de interés (Javois, 1999).

Se siembran 500 μ l de una suspensión conteniendo 2×10^4 células RAW 264.7 en microcámaras tipo Nunc[®] Lab-Tec[®] Chamber Slide[™] (Thermo Fisher Scientific) y se

incubaban 24 h. Se elimina el medio y se añaden 440 μ l de DMEM con 0.5% de FBS. A las 3 h se añaden 10 μ l de los compuestos de ensayo (Cf: 1.0 μ M) y se deja incubar a 37.0 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 1 h. Las células (control y tratamientos) se estimulan mediante la adición de 50 μ l de LPS (Cf: 1 μ g/ml) a 37.0 °C durante 30 min. Las células se fijan con una disolución de MeOH: HAcO (95:5) durante 20 min a -20 °C, se lavan con PBS y se permeabilizan con una disolución de Triton X-100 al 0.3% en PBS a 4 °C durante 18 h, luego se bloquea con BSA al 5 % en una disolución de Triton X-100 al 0.1 % en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las células se incuban con el anticuerpo policlonal de conejo anti-NF- κ Bp65 (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluido 1:50 en una disolución de BSA al 1% en Triton X-100 al 0.1% en PBS durante 2 h en cámara de humectación a 37 °C. Se lavan las células dos veces con Triton X-100 al 0.1% en PBS y se incuban con una dilución 1:1000 del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen, USA) durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Se repiten los lavados y se tiñe el DNA con una disolución de DAPI (de 6,4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, en inglés) de 0.02 μ g/ml en Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente y oscuridad. Se repiten los lavados y se montan las muestras con medio Vectashield[®] (Vector Laboratories Inc., USA). Las imágenes se examinan y adquieren con un microscopio de fluorescencia Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc, USA) conectado a una fuente de luz UV y a una computadora que cuenta con el programa ACT-1 (Nikon Instruments Inc).

IV.3.10. Evaluación de la translocación de NF- κ B por EMSA

El EMSA (de *Electrophoretic Mobility Shift Assay* en inglés) es un ensayo que proporciona un método simple y rápido para detectar interacciones proteína-DNA. Se basa en la separación de DNA libre de complejos proteína-DNA, debido a las diferencias en sus movilidades electroforéticas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Este método es usado en el estudio de unión de proteínas a secuencias específicas del DNA, como factores de transcripción. El ensayo consiste en incubar la proteína purificada o extractos nucleares o celulares, con un oligonucleótido que contiene el sitio de unión de la proteína. Los productos de reacción son analizados mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida no

desnaturalizante y transferidos a una membrana para su revelado. El oligonucleótido es marcado previamente en el extremo 3' con digoxigenina que será reconocida por un anticuerpo conjugado con una enzima (por ejemplo fosfatasa alcalina, anti-digoxigenina-AP), que permite la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante sustratos luminiscentes. Existen otros tipos de marcado como por ejemplo isótopos radiactivos o biotina, y las enzimas conjugadas al anticuerpo pueden catalizar también reacciones coloreadas en lugar de luminiscentes. La migración diferencial es consecuencia del tamaño y de la carga de la molécula, de modo que los complejos proteína-DNA migrarán a menor velocidad que el DNA libre, quedando más próximos al punto de carga (Molloy, 2000).

Se emplea el DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation (Roche, Germany) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante como se describe a continuación.

a) Tratamiento celular

Se siembran 5 ml de una suspensión conteniendo 5×10^6 células RAW 264.7 en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. Se incuban a 37.0 °C durante 24 h. Se reemplaza el medio por 4375 µl de DMEM con FBS al 0.5% (4875 µl para las células blanco). Se incuba a 37.0 °C durante 3 h. Se adicionan 125 µl de los compuestos de ensayo (Cf: 1.0 µM) y se incuba a 37.0 °C durante 1 h (o vehículo, para las células blanco y control). Las células (control y tratamientos) se estimulan mediante la adición de 500 µl de LPS (Cf: 1 µg/ml) y se incuban a 37.0 °C durante 1 h. Se procede a la extracción de proteína nuclear.

b) Extracción de la proteína nuclear

Las células se lavan dos veces con PBS a 4 °C, se desprenden utilizando un “scraper” con 1.5 ml de tampón A a 4 °C, el lisado se coloca en un eppendorff, se incuba en hielo por 10 min y luego se centrifuga a 2150×g durante 5 min a 4 °C. El “pellet” se resuspende en 200 µl en tampón B a 4 °C, se incuba y centrifuga como se describió antes (el sobrenadante constituye la fracción citosólica). El “pellet” se resuspende en 50 µl de tampón C y se incuba en hielo durante 5 min. Se adicionan 5 µl de NaCl 5 M y se incuba en hielo durante 30 min con agitación. La mezcla se centrifuga a 20800×g durante 15 min a 4 °C y se reserva el sobrenadante para cuantificar proteína nuclear y realizar el EMSA.

c) Cuantificación de proteína

Después de la centrifugación, las proteínas presentes en los extractos nucleares se cuantifican con el método de Bradford. Se realiza una dilución del sobrenadante 1/5 en agua millipore, 10 µl se colocan por duplicado en una placa de 96 pocillos, se adicionan 250 µl del reactivo de Bradford, se incuba durante 15 min y se mide la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolan en una recta estándar de BSA para obtener las concentraciones de proteína de las muestras. Conociendo estas concentraciones, se calcula el volumen a tomar que contenga 5 µg de proteína para realizar el EMSA.

d) Marcación del oligonucleótido

Se utiliza el oligonucleótido de doble cadena (Promega) que contiene en su secuencia (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' y 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5') sitios de unión para el factor de transcripción NF-κB. El oligonucleótido se marca con digoxigenina-11-ddUTP (DIG-ddUTP) como se describe a continuación.

Se colocan 100 ng del oligonucleótido en eppendorf de 200 µl en baño de hielo y se lleva a un volumen final de 10 µl con agua bidestilada estéril. Se adicionan 4 µl de tampón de marcación 5X, 4 µl de CoCl₂ (25 mM), 1 µl DIG-ddUTP (1 mM) y 1 µl de transferasa terminal (400 U). Se mezcla y se centrifuga brevemente. Se incuba a 37 °C durante 15 min. Se coloca en baño de hielo y se detiene la reacción por el agregado de 2 µl de EDTA (0.2 M, pH 8.0). Se adicionan 3 µl de agua bidestilada estéril para obtener un volumen final de 25 µl donde la concentración del oligonucleótido marcado será de 4 ng/µl.

Se determina la eficiencia de marcación por comparación entre series de diluciones del oligonucleótido propio y de un control suministrado por el fabricante.

e) Reacción de formación del complejo proteína-DNA

Se diluye el oligonucleótido marcado a 0.4 ng/µl, se calculan los volúmenes equivalentes a 5 µg de extracto nuclear y se prepara en eppendorf de 200 µl, en baño de hielo, la mezcla de reacción como se indica a continuación (**Tabla 1**):

Tabla 1. Protocolo para la mezcla de reacción de EMSA.

	Blanco	Control	Ensayo de Competición*	Muestras
Tampón de unión	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Oligonucleótido marcado (0.4 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Oligonucleótido sin marcar (0.1 µg/µl)	–	–	1 µl	–
Poli [d(I-C)] (1 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Extracto nuclear	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg
Agua bidestilada: llevar a	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

* El ensayo de competición se realiza con el extracto nuclear de las células control.

Se mezcla cuidadosamente y se incuba a 25 °C durante 15 min. Se colocan los eppendorfs en baño de hielo y se adicionan a cada uno, 5 µl de tampón de carga. Se procede inmediatamente a la realización de la electroforesis. El tampón de carga está constituido por TBE 0.25x, glicerol 40% y azul de bromofenol 0.2%.

Para prevenir uniones inespecíficas de la proteína analizada al oligonucleótido marcado, se adiciona poli [d(I-C)] como competidor no específico.

Como control interno de la técnica, se realiza el ensayo de competición. Las células del control, estimuladas con LPS, mostrarán la banda de interacción proteína-DNA más intensa. En el ensayo de competición, en el que se usa el mismo extracto nuclear, esta banda no se observará ya que en la mezcla de reacción se incorpora oligonucleótido sin marcar, más de 125 veces más concentrado que el marcado, de modo que existe mayor probabilidad de que la proteína se una a él.

f) Electroforesis

El día anterior a la realización del ensayo EMSA se prepara el gel de poliacrilamida al 6% en tampón TBE 0.5 X para asegurar su completa polimerización. Mientras se lleva a cabo la reacción de formación de complejo proteína-DNA el gel se pre-corre a 80 V durante 30 min en tampón TBE 0.5 X. Se cargan las muestras en el gel y se inicia la electroforesis a 80 V hasta que las muestras hayan recorrido 2/3 del gel.

La composición del gel consiste en 3.15 ml de acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v, 0.15 ml de acrilamida 40% p/v, 2 ml TBE 5x, 1 ml glicerol 50%, 150 µl persulfato de amonio 10 %, 20 µl TEMED y agua c.s.p. 20 ml.

g) Transferencia

Los productos de reacción separados en la electroforesis se transfieren desde el gel a una membrana de nylon cargada positivamente Hybond-N+ (GE Healthcare) mediante el sistema semiseco utilizando el equipo HoeferTM TE 70 (Amersham Biosciences, USA) Se corta la membrana del tamaño del gel y se equilibra en tampón TBE 0.5 X durante 5 min. Se coloca la membrana sobre el gel. Se cubre la membrana con cuatro hojas de papel Whatman 3MM sumergidas previamente en el tampón, luego se gira de modo que quede la superficie libre del gel hacia arriba y se cubre el gel del mismo modo. En todo el proceso se cuida que no queden burbujas atrapadas entre las superficies en contacto. El sándwich resultante se coloca en el equipo de transferencia cuidando que el gel quede orientado hacia el cátodo y se inicia la transferencia a 30 V y 300 mA durante 1 hora.

h) Fijación

Finalizada la transferencia, se coloca la membrana a 120 °C durante 30 min para fijar los productos de reacción transferidos.

i) Detección

La membrana se lava durante 5 min en tampón de lavado y se incuba durante 30 min en 100 ml de disolución de bloqueo. Luego se incuba en 20 ml de disolución de anticuerpo anti-digoxigenina-AP (1:10000 en disolución de bloqueo) durante 30 min. Se hacen dos lavados de 15 min con 100 ml de tampón de lavado y se equilibra durante 5 min en 20 ml de tampón de detección. Se cubre la membrana con 1 ml del sustrato quimioluminiscente CSPD y se detecta la señal en el equipo de captura digital de imágenes, LAS 3000 mini (Fujifilm). El análisis densitométrico de las señales se realiza mediante el programa Multi Gauge v2.0 (Fujifilm).

El tampón de lavado consiste en ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y Tween 20 0.3% v/v. El tampón de detección: Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5. La disolución de bloqueo y el reactivo CSPD son provistos por el kit.

IV.3.11. Expresión transitoria del gen que se halla bajo regulación de NF- κ B

La transfección celular es una técnica que permite la introducción de ácidos nucleicos en el interior de las células eucariotas. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado la secuencia codificante de un gen reportero, por ejemplo luciferasa, bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar, permite medir con facilidad la expresión génica en diferentes situaciones experimentales y entre otras cosas, posibilita ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica en sistemas celulares.

Las técnicas de transfección incluyen métodos físicos, basados en la introducción mecánica de la molécula dentro de la célula, como microinyección directa o electroporación, y métodos químicos, basados en la capacidad de las células de incorporar complejos mediante alguna ruta o a través de la membrana, como el método del fosfato cálcico, el método del dietilaminoetil dextrano y el método de lipofección. Este último hace uso de liposomas catiónicos que se mezclan con el DNA; estos liposomas hacen de transportadores del DNA, facilitando su entrada al fusionarse con la membrana plasmática. Cómo llega el DNA al núcleo es uno de los aspectos menos conocido de la transfección. La lipofección da una eficiencia de transfección alta y baja toxicidad (Cultek, 2006).

La transfección se clasifica como transitoria o estable dependiendo del tiempo que se mantiene la expresión del plásmido. En la transfección transitoria el transgen no se incorpora al DNA celular por lo que su expresión se observa entre 1 a 3 días. Después de este tiempo la expresión disminuye y se pierde, debido a que el DNA plasmídico a pesar de replicarse, no se segrega fielmente en ambas células hijas y con el tiempo, una fracción sustancial de células en el cultivo, no contendrá el plásmido. En la transfección estable se pretende obtener células que hayan incorporado el transgen en su genoma, es decir, que transmitirán la información genética a sus células hijas, generándose así un clon modificado genéticamente que mantiene la expresión de forma estable. Esta integración del DNA transfectado ocurre al azar con una frecuencia de una de cada 10000 células. Para lograrlo se hace una selección de las células estables con un antibiótico de selección, normalmente G418 (resistencia a neomicina), higromicina o puromicina (Lodish *et al.*, 2005).

Para la detección de las células transfectadas y como sistema de normalización entre distintos experimentos se utilizan los genes marcadores o reporteros. Son genes que codifican

para enzimas o proteínas que mediante técnicas estandarizadas se pueden medir o detectar, por ejemplo el gen de la luciferasa. La luciferasa es una enzima que cataliza la oxidación de las luciferinas, reacción que emite luz. La luz producida puede medirse y cuantificarse en un luminómetro (Castro y Portelles, 1997; González y Vega, 2007).

En nuestro estudio, células RAW 264.7 se transfectaron transitoriamente con el plásmido (NF- κ B)-PL, que contiene un elemento de respuesta a NF- κ B que conduce a la transcripción del gen reportero de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Con el fin de normalizar la expresión de (NF- κ B)-PL, las células fueron co-transfectadas con el plásmido TK-RL que codifica para la luciferasa de renilla (*Renilla reniformis*) bajo el control del promotor constitutivamente activo de la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV-TK) que proporciona niveles bajos a moderados de la expresión de la luciferasa de renilla. Así, este método de normalización, posibilita la utilización de un sistema dual de detección en el que en el mismo cultivo celular se determinan de manera secuencial las actividades de ambas luciferasas.

Los plásmidos utilizados fueron donados por la Dra. Lidija Klampfer del Albert Einstein Cancer Center de Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, y se recibieron impregnados en papel de filtro. Las zonas impregnadas fueron recortadas y maceradas durante 10 min a temperatura ambiente con 30 μ l de tampón TE del QIAGEN HiSpeed[®] Plasmid Maxi Kit (Quiagen) con el fin de extraer los plásmidos que se amplificarán en *Escherichia coli* DH5 α competentes. Luego de extraídos, la concentración de plásmidos fue obtenida espectrofotométría.

a) Transformación de *Escherichia coli* DH5 α competentes

La transformación es el proceso por el cual una bacteria incorpora DNA exógeno del medio. Para que esto ocurra, las bacterias deben encontrarse en el estado fisiológico de competencia que se caracteriza por alteraciones en su membrana celular, lo que permite la entrada del plásmido a la célula. No todas las bacterias son competentes, sin embargo en algunas cepas esta capacidad puede inducirse mediante el tratamiento con agentes físicos o químicos que alteran la membrana aumentando su permeabilidad y facilitando de esta forma la incorporación del DNA (Molholt y Doskočil, 1978; Müller-Esterl, 2008).

Con esta técnica se busca amplificar los plásmidos (NF- κ B)-PL y TK-RL que posteriormente serán purificados a partir de las células transformadas para ser utilizados en el ensayo de transfección.

Las bacterias *E. coli* DH5 α (Subcloning efficiencyTM DH5 α TM Competent Cells) fueron compradas a Life Technologies Invitrogen[®] (USA) y para su transformación se sigue el protocolo recomendado por el fabricante. Las células se descongelan en baño de hielo y se colocan 50 μ l de la suspensión en dos eppendorf de 1.5 ml enfriados en el mismo baño. Se agregan a cada eppendorf 10 ng del plásmido correspondiente, se agita suavemente y se incuba durante 30 min en baño de hielo. Se somete la mezcla a un choque térmico de 20 s en un baño a 37 °C sin agitar. Se incuba en baño de hielo durante 2 min y se adicionan 950 μ l de medio Luria Bertani (LB) a temperatura ambiente. Se incuba a 37 °C con agitación durante 1 h. Se siembran 200 μ l en placas con agar LB con ampicilina (100 μ g/ml) como antibiótico de selección de las bacterias transformadas y se incuban en posición invertida durante 18 h. Se inoculan dos tubos de ensayo conteniendo 3 ml de medio LB con ampicilina con una colonia aislada de cada placa y se incuba a 37 °C con agitación durante 8 h. Se toma 1 ml de cada cultivo y se inoculan dos erlenmeyer conteniendo 200 ml de medio LB con ampicilina y se incuban a 37 °C con agitación durante 16 h. A 5 ml de ambos cultivos se les adicionan 1 ml de glicerol y se congelan alicuotados en crioviales a - 80 °C. El resto de los cultivo se utiliza para la purificación de los plásmidos.

b) Purificación de plásmidos

Los plásmidos amplificados se purifican con el QIAGEN HiSpeed[®] Plasmid Maxi Kit siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

c) Cálculo de la concentración de DNA mediante espectrofotometría

El DNA absorbe luz de la región ultravioleta, con un pico de absorbancia a 260 nm. Este punto se encuentra próximo al pico de absorbancia de las proteínas (280 nm). La medida de ambas absorbancias permite estimar la concentración de DNA y la presencia de otras sustancias en la muestra. Las disoluciones puras de DNA tienen un valor de relación A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2 y la concentración expresada en μ g/ml se calcula mediante la fórmula:

$$C = A_{260} \times 50 \times \text{factor de dilución}$$

Para determinar las concentraciones de plásmidos obtenidos se preparan diluciones de 1:200 de cada uno de ellos y se miden sus absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 10 Bio (Thermo Scientific).

d) Transfección y Tratamiento celular

Se siembra 1 ml de una suspensión conteniendo 2.5×10^5 células RAW 264.7 en placas de 24 pocillos con DMEM suplementado con FBS al 10% y sin antibiótico y se incuban durante 24 h a 37.0 °C. Se aspira el medio de cultivo y se adicionan 400 µl de medio Opti-MEM™ (Gibco) previo lavado de las células con este medio y se incuban durante 10 h. Se adicionan a cada pocillo 100 µl de la mezcla de transfección.

La transfección se realiza utilizando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante: se mezclan cuidadosamente 50 µl/pocillo de Opti-MEM™ con 2 µl/pocillo de Lipofectamina™ 2000 y 50 µl/pocillo de Opti-MEM™ con 0.8 µg de los dos plásmidos [0.5 µg de (NF-κB)-PL y 0.3 µg de TK-RL]. Se incuban a temperatura ambiente durante 5 min y luego se combinan las diluciones de Lipofectamina™ 2000 y de plásmidos dando un volumen final de 100 µl de mezcla de transfección. Se mezcla cuidadosamente y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.

Luego de adicionados los 100 µl de la mezcla de transfección por pocillo se incuba a 37.0 °C durante 18 h. Se reemplaza el medio por 875 µl de DMEM con FBS 0.5% sin antibiótico (975 µl para las células blanco) y se incuba a 37.0 °C durante 3 h. Se adicionan 25 µl de los compuestos de ensayo (Cf: 5.0, 1.0 y 0.1 µM) o vehículo (células blanco y control) y se incuba a 37.0 °C durante 1 h. Las células (tratamientos y control) se estimulan mediante la adición de 100 µl de LPS (Cf: 1 µg/ml) y se incuban a 37.0 °C durante 18 h. La medida de luminiscencia se realiza empleando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA) siguiendo el protocolo del fabricante: se remueve el medio de las células y se lavan con PBS, se lisan con 100 µl de PLB (Passive Lysis Buffer) y se incuba a temperatura ambiente con agitación durante 15 min. Se colocan en placa de 96 pocillos 100 µl del reactivo LAR II (Luciferase Assay Reagent II) y se transfieren 20 µl de los lisados celulares a los pocillos conteniendo LAR II, se mezcla por pipeteo y se realiza la medida de luminiscencia, debida a la actividad de la luciferasa de luciérnaga, con un luminómetro Victor™ X3 (Perkin Elmer, USA). Una vez registrada la señal, se añaden en los mismos

pocillos 100 μ l del reactivo Stop & Glo, que detiene la señal luminiscente generada por la luciferasa de luciérnaga e inicia la de renilla, se agita delicadamente, se coloca la placa en el luminómetro y se inicia la lectura. La actividad luciferasa de luciérnaga (que es una medida indirecta de la activación de NF- κ B) se normaliza respecto a la de luciferasa de renilla y los resultados se expresan tomando a las células blanco (sin estimular y sin tratamiento) como unidad.

IV.3.12. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm error estándar de la media para n observaciones.

El análisis de la significancia estadística de las diferencias observadas entre los grupos, se realiza mediante el ensayo de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett para comparaciones múltiples.

En ANOVA se obtiene F (varianza **entre** los grupos/ varianza **dentro** de los grupos). Un valor de $F \geq F_{\text{tabla}}$ nos indica que la diferencia entre las medias no es aleatoria, con una probabilidad de error menor al 5% ($p < 0.05$) o al 1% ($p < 0.01$), o dicho de otro modo, que las diferencias entre las medias (entre los grupos) son mayores que las diferencias entre los sujetos dentro de los grupos; pero no nos dice entre qué medias está o están las diferencias. Para comparar las muestras de dos en dos hay diversos métodos. El método de Dunnett es el más adecuado cuando se quiere comparar las medias de los grupos experimentales (tratamientos) con un grupo de control.

En las representaciones gráficas en columnas, la presencia del símbolo * por encima de la barra de error, indica que hay diferencia significativa con $p < 0.05$; la presencia de **, que hay diferencia significativa con $p < 0.01$; la presencia de ***, que hay diferencia significativa con $p < 0.001$, la presencia de ****, que hay diferencia significativa con $p < 0.0001$ y el símbolo ns, que la diferencia no es significativa.

V. RESULTADOS

V.1. Fracción enriquecida en flavonoides. Obtención y determinación de su composición

La obtención de la fracción enriquecida en flavonoides (FEF) se realizó a partir de un extracto butanólico obtenido previamente por Ríos y colaboradores (1990) según la marcha expuesta a continuación: las raíces secas y pulverizadas de *C. tayuya* fueron extraídas sucesivamente con cloroformo y metanol; el extracto metanólico fue llevado a sequedad, resuspendido en agua y sometido a sucesivas extracciones líquido-líquido con cloroformo, luego con acetato de etilo y finalmente con butanol. Los extractos fueron llevados a sequedad en evaporador rotatorio.

El extracto butanólico (2 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna de sílicagel. La columna se eluyó en gradiente con mezclas de acetato de etilo en metanol (90%, 80%, 50% y 0%). Se obtuvieron 600 fracciones de 20 ml cada una. El seguimiento de la elución se realizó por TLC, reuniendo las fracciones que poseían características cromatográficas análogas.

Las fracciones 85 a 108, eluidas con acetato de etilo en metanol al 90 % se reunieron por similitud cromatográfica, constituyendo la FEF. Este extracto se llevó a sequedad en evaporador rotatorio rindiendo 276 mg (14 % respecto del extracto butanólico).

El análisis de la FEF por TLC en sílicagel, indicó la presencia de cuatro compuestos. Fueron identificados por comparación de los parámetros obtenidos mediante TLC (**Figura 1**) y HPLC (**Figura 2**) con datos informados previamente por Bauer *et al.* (1985) como vicenin-2, spinosin, swertisin e isovitexin. Sin embargo, el análisis por TLC en poliamida reveló la presencia de un quinto compuesto.

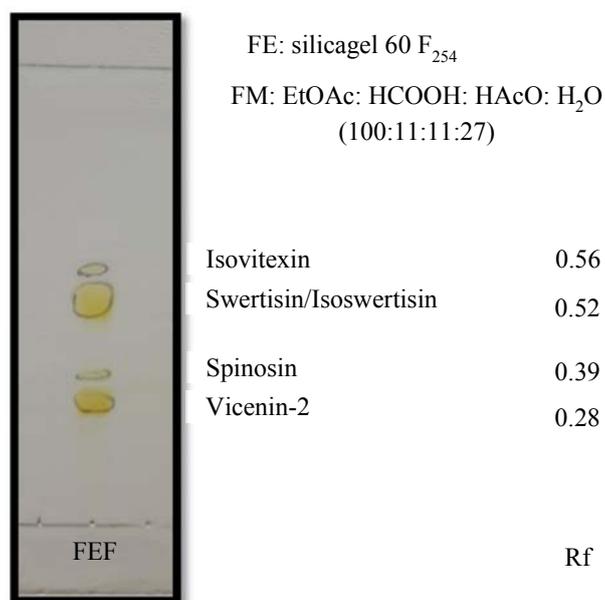


Figura 1. TLC en silicagel de la FEF.

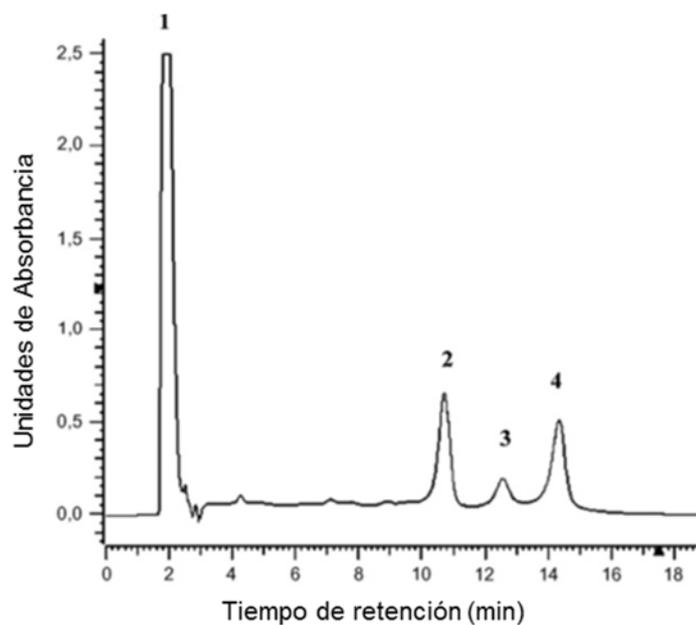


Figura 2. Separación por HPLC de la FEF de raíces de *Cayaponia tayuya*. (1) vicenin-2 ($t_r = 2.05$); (2) spinosin ($t_r = 10.72$); (3) isovitexin ($t_r = 12.59$), y (4) swerticin + isoswerticin ($t_r = 14.35$). Columna LiChrospher RP-18 (5 μm) 125-4 (Merck); eluyente CH₃CN-H₂O-HOAc (18:82:1); velocidad de flujo: 1.0 ml/min; longitud de onda de detección: 340 nm. t_r = tiempo de retención (min). Las proporciones de cada flavonoide en la mezcla son: 13.5 (1):4.1 (2):1 (3):3.7 (4).

Para identificarlo, la FEF fue sometida a una VLC. Las fracciones 13 a 23 resultaron en un compuesto puro (**Figura 3**) que fue identificado por ^{13}C RMN y comparación con datos bibliográficos como swertisin. Las fracciones 24 a 92 resultaron en una mezcla de dos compuestos (**Figura 3**); uno de ellos, el identificado como swertisin, y el otro, identificado a partir de esta mezcla por comparación de datos de ^{13}C RMN como isoswertisin. La elucidación estructural fue realizada por el Dr. JL Ríos Cañavate de la Facultad de Farmacia de la UV, España, y los desplazamientos coinciden con los publicados por Agrawal (1989).

De este modo, la llamada FEF, resultó ser una mezcla de flavonoides identificados como vicenin-2, spinosin, swertisin, isoswertisin e isovitexin.

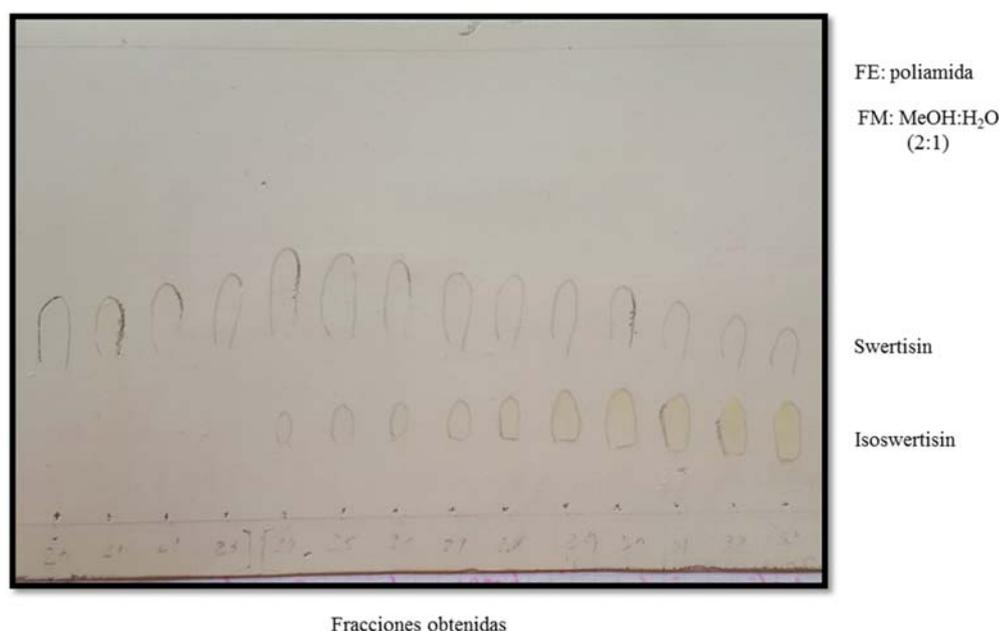


Figura 3. TLC en poliamida de algunas de las fracciones obtenidas de la FEF sometida a VLC.

V.2. Ensayos *in vivo*

V.2.1. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA

Se estudió la actividad antiinflamatoria de la FEF en un modelo de edema agudo en oreja de ratón. La formación del edema se indujo por una única aplicación de TPA. Se utilizó

indometacina como fármaco de referencia, cuyo efecto antiinflamatorio es máximo a las 4 h de aplicación y realizada de manera simultánea a la de TPA (Payá *et al.*, 1993).

En la **Figura 4** se observa que la FEF, aplicada al grupo problema a razón de 0.5 mg/oreja, inhibió el edema en un 66% comparada con el grupo control (sólo recibió TPA). El fármaco de referencia, indometacina, redujo el edema en un 88%. El gráfico de barras muestra el incremento de peso (ΔP) \pm S.E.M. de las orejas derechas, producido por el edema, medido con respecto a las orejas izquierdas (utilizadas como blanco), para los grupos control (12.2 ± 2.0), referencia (1.4 ± 0.5) y problema (4.2 ± 0.9).

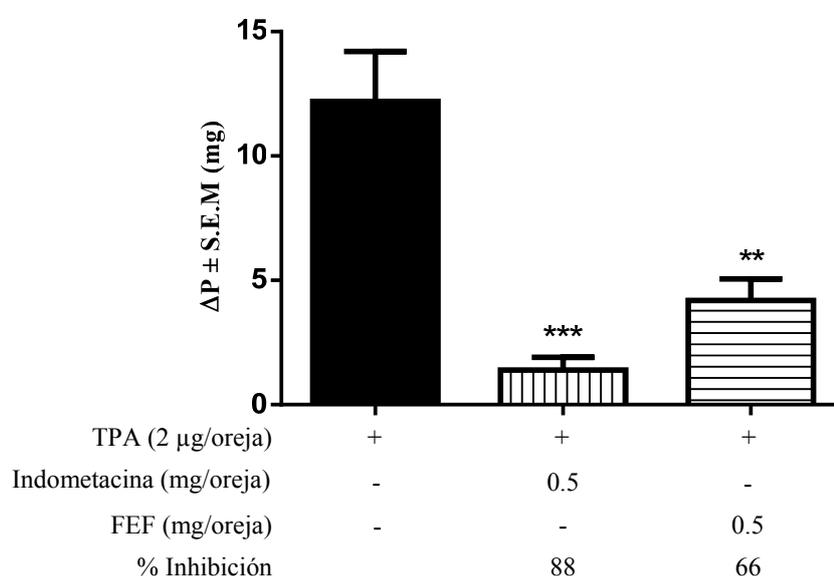


Figura 4. Efecto de la FEF sobre el edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA. El incremento de peso de las orejas (ΔP) en mg fue calculado respecto a las orejas izquierdas de cada grupo, las cuales recibieron solamente acetona utilizada como vehículo. Para cada grupo de animales se representa el valor $\Delta P \pm$ S.E.M; $n = 5$ animales; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control, analizados mediante ANOVA y test de la t de Dunnett. Los porcentajes de inhibición fueron expresados como la reducción del incremento en el peso de las orejas con respecto al grupo control que solo recibió TPA.

V.2.2. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicaciones múltiples de TPA

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de la FEF en un modelo de inflamación subcrónico en oreja de ratón. El proceso inflamatorio fue inducido por aplicaciones tópicas repetidas de TPA en dosis de 2 µg/oreja. Se utilizó dexametasona como fármaco de referencia en dosis de 0.025 mg/oreja.

La **Figura 5** muestra que la FEF, aplicada al grupo problema de manera repetida y tópica, a dosis de 0.5 mg/oreja según el esquema indicado en Materiales y Métodos, redujo la inflamación inducida por TPA en un 37% comparada con el grupo control (sólo recibió TPA), mientras que dexametasona lo hizo en un 90%. El gráfico de barras representa el incremento de peso (ΔP) \pm S.E.M. de las orejas, producido por el edema, medido con respecto a las orejas del grupo blanco, para los grupos control (12.1 ± 1.7), referencia (1.2 ± 0.4) y problema (7.8 ± 0.9).

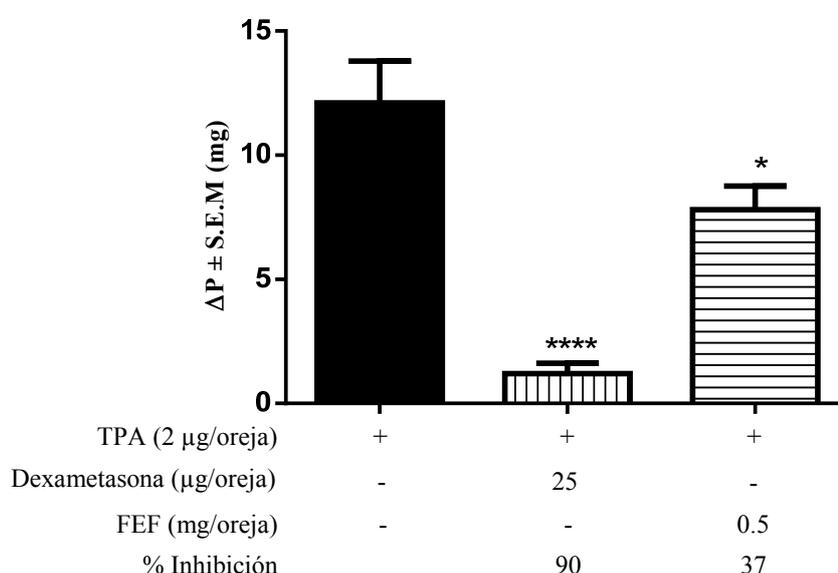


Figura 5. Efecto de la FEF sobre el edema subcrónico en oreja de ratón inducido por TPA. El incremento de peso de las orejas (ΔP) en mg fue calculado respecto al grupo blanco, el cual recibió solamente acetona utilizada como vehículo. Para cada grupo de animales se representa el valor $\Delta P \pm$ S.E.M; $n = 5$ animales; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ respecto al control, analizados mediante ANOVA y test de la t de Dunnett. Los porcentajes de inhibición fueron expresados como la reducción del incremento en el peso de la orejas con respecto al grupo control que solo recibió TPA.

V.3. Ensayos *in vitro*

V.3.1. Ensayo de viabilidad celular

V.3.1.1. *ent*-kauranos

Xerophilusin A (**1**), xerophilusin B (**2**), longikaurin B (**3**) y xerophilusin F (**4**) fueron evaluados en macrófagos RAW 264.7 en concentraciones de 0.10 a 50.00 μM durante 24 h.

La viabilidad de las células tratadas se calcula respecto a las células control (sin tratamiento). **1** y **2** muestran no ser tóxicos a 5.00 μM , mientras que **3** no muestra toxicidad a 10.00 μM y **4** a 25.00 μM . A esas concentraciones, la viabilidad es mayor al 97.5%. En la **Tabla 1** se exponen los valores de las CI_{50} calculadas a partir de curvas de % de viabilidad vs concentración de al menos cuatro concentraciones.

Tabla 1. CI_{50} de **1**, **2**, **3** y **4** sobre la viabilidad de RAW 264.7. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres experimentos en los que fueron obtenidas las curvas de regresión de la gráfica % de Viabilidad vs Concentración. El % de Viabilidad fue calculado respecto al grupo de células control (sin FEF).

Compuestos	CI_{50} (μM)	r^2
1	11.25 \pm 0.33	0.9993
2	10.14 \pm 0.25	0.9966
3	44.80 \pm 0.27	0.9958
4	52.39 \pm 0.15	1.0000

V.3.1.2. Fracción enriquecida en flavonoides

La FEF, probada en un rango de concentraciones de 5.0 a 60.0 $\mu\text{g/ml}$, no resultó citotóxica para los macrófagos RAW 264.7 a concentraciones inferiores a 35 $\mu\text{g/ml}$, mostrando un porcentaje de viabilidad celular superior al 95%. La **Figura 6** muestra el porcentaje de viabilidad \pm S.E.M para tres de las concentraciones ensayadas: 98.5 \pm 0.7 % a 20 $\mu\text{g/ml}$, 91.8 \pm 0.5 % a 40 $\mu\text{g/ml}$ y 83.4 \pm 0.8 % a 60 $\mu\text{g/ml}$.

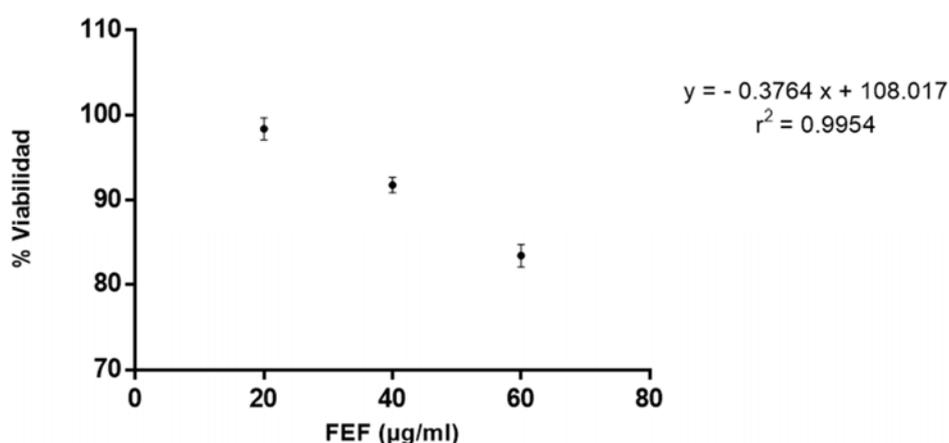


Figura 6. % de viabilidad de las células RAW 264.7 tratadas con la FEF respecto a células que no recibieron el tratamiento. Los valores expresan la media \pm S.E.M para $n = 3$. Se muestra la ecuación de la recta obtenida mediante el análisis de regresión.

V.3.2. Determinación de NO

V.3.2.1. *ent*-kauranos

La inhibición de la producción de NO fue ensayada en células RAW 264.7 pretratadas (1 h) con **1 a 4** y estimuladas con LPS (Cf: 1 µg/ml) durante 24 h en concentraciones de 0.05 a 5.00 µM. Se cuantificó la producción de nitritos, metabolito estable del NO, por interpolación en una curva de calibración de los valores de absorbancia obtenidos y se calculó el porcentaje de inhibición debido a los tratamientos respecto a las células control. Todos los *ent*-kauranos inhibieron la producción de NO de manera dosis dependiente. En la **Tabla 2** se exponen las CI₅₀ calculadas a partir de curvas dosis-respuesta de al menos cuatro concentraciones.

Tabla 2. CI₅₀ de **1, 2, 3 y 4** sobre la producción de NO en RAW 264.7. Los datos representan la media ± S.E.M de tres experimentos.

Compuestos	CI ₅₀ (µM)	r ²
1	0.60 ± 0.08	0.9649
2	0.22 ± 0.03	0.9627
3	0.43 ± 0.05	0.9930
4	0.67 ± 0.09	0.9443

V.3.2.2. Fracción enriquecida en flavonoides

El tratamiento de macrófagos RAW 264.7 con la FEF y estimulados con LPS, redujo la producción de nitritos de manera dosis dependiente como muestra la **Figura 7**. Los porcentajes de inhibición fueron de 19.8 ± 2.3 % a 23.0 µg/ml y 41.2 ± 5.7 % a 35.0 µg/ml.

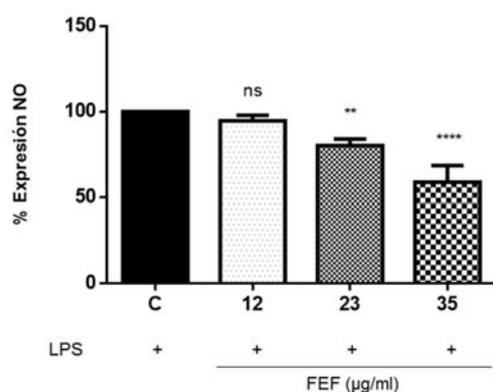


Figura 7. Efecto de la FEF sobre la producción de NO. Células RAW 264.7 fueron estimuladas con LPS (1 µg/ml, 24 h) y pretratadas con la FEF (12.0, 23.0 y 35.0 µg/ml, 1 h). Se obtuvieron las concentraciones de nitritos por interpolación con una curva patrón. Los % de expresión se calcularon respecto al control (estimadas con LPS y sin tratamiento). Los valores representan la media ± S.E.M; n = 3; ns no significativa, ** p < 0.01 y **** p < 0.0001 respecto al control.

V.3.3. Determinación de la producción de TNF- α

La producción de citocina proinflamatoria TNF- α se determinó a partir del sobrenadante celular de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (24 h) y pretratados (1h) con la FEF a 23.0 y 35.0 $\mu\text{g/ml}$. La **Figura 8** muestra que el tratamiento a 35.0 $\mu\text{g/ml}$ aumentó la producción de TNF- α respecto al grupo control (sólo recibieron LPS). Los valores representan la media de la concentración de TNF- α expresada en $\text{pg/ml} \pm \text{S.E.M}$ para los grupos Blanco (24982 ± 1296), Control (68760 ± 1798), y los que recibieron la FEF a 23.0 $\mu\text{g/ml}$ (69904 ± 3207) y a 35.0 $\mu\text{g/ml}$ (89682 ± 4236).

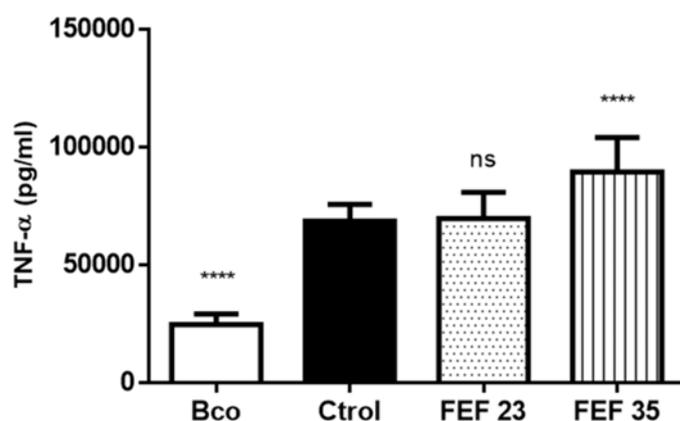


Figura 8. Efecto de la FEF sobre la producción de TNF- α . Macrófagos RAW 264.7 fueron estimulados con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) y pretratados con la FEF (23.0 y 35.0 $\mu\text{g/ml}$, 1 h). A partir del sobrenadante celular se determinó la concentración de TNF- α (pg/ml) con ayuda de un kit de ELISA. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M; $n = 6$; ns: no significativo, **** $p < 0.0001$ respecto al control (células estimuladas y sin tratamiento).

V.3.4. Determinación de la inducción de iNOS y COX-2 por Western blot

V.3.4.1. *ent*-kauranos

La expresión de iNOS fue ensayada en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Cf: 1 $\mu\text{g/ml}$) y tratadas con **1** a **4** durante 24 h en concentraciones de 0.1, 1.0 y 5.0 μM , por la técnica de western blot. La cuantificación de iNOS se realizó normalizando los valores obtenidos respecto a β -actina, y expresando estos valores como porcentajes respecto al control (sólo recibieron LPS). Los gráficos de barras, que representan los datos derivados del análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (**Figura 9**), muestran que todos los compuestos inhiben la expresión de iNOS de manera dosis dependiente.

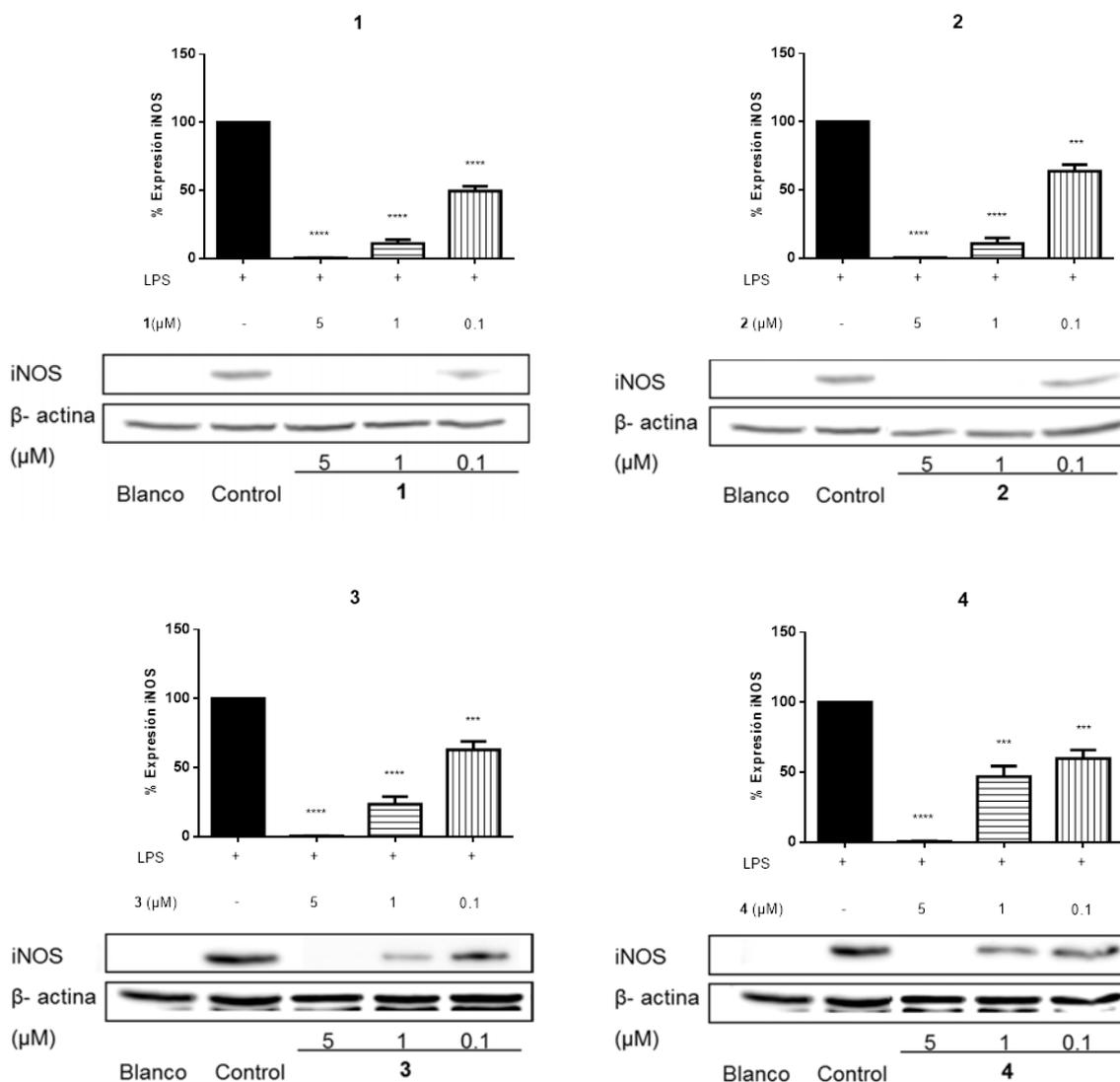


Figura 9. Efecto de **1**, **2**, **3** y **4** (5.0, 1.0, y 0.1 μM) sobre la expresión de iNOS en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 μg/ml, 24 h) detectado con ayuda de la técnica de western blot. Las imágenes inferiores son representativas de cinco experimentos con resultados similares. B: blanco (células sin estimulación ni tratamiento); C: control (células estimuladas con LPS y sin tratamiento). Los gráficos de barras superiores son resultado del análisis densitométrico de todas las imágenes obtenidas; representan el % de expresión de iNOS expresado como la media ± S.E.M; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respecto al control.

V.3.4.2. Fracción enriquecida en flavonoides

La expresión de iNOS y de COX-2 fue evaluada en células RAW 264.7 pretratadas con la FEF (1 h) y estimuladas con LPS (Cf: 1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h a concentraciones de 23.0 y 35.0 $\mu\text{g/ml}$, por la técnica de western blot. La cuantificación de las enzimas se realiza normalizando los valores obtenidos respecto a β -actina, y expresando estos valores como porcentajes respecto al control. La **Figura 10** muestra a partir de las imágenes representativas obtenidas y de los datos derivados de sus análisis densitométricos, que la FEF inhibe la expresión de iNOS ($97.2 \pm 0.4\%$ a 23.0 $\mu\text{g/ml}$ y $98.3 \pm 0.3\%$ a 35.0 $\mu\text{g/ml}$) y la de COX-2 ($50.5 \pm 3.6\%$ a 23.0 $\mu\text{g/ml}$ y $51.1 \pm 3.5\%$ a 35.0 $\mu\text{g/ml}$).

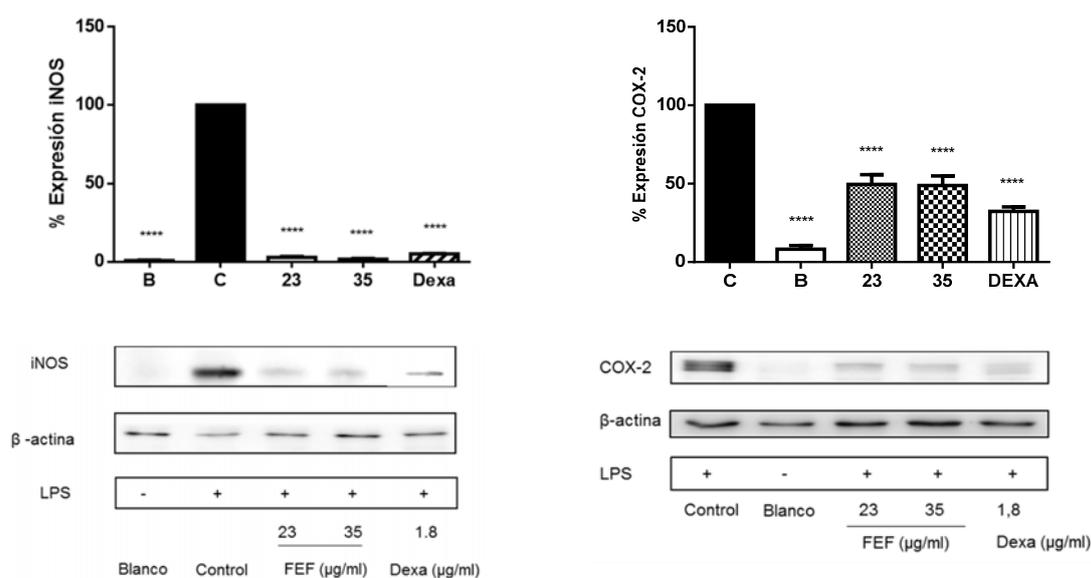


Figura 10. Efecto de la FEF sobre la expresión de iNOS (izquierda) y COX-2 (derecha). Células RAW 264.7 se estimularon con LPS 1 ($\mu\text{g/ml}$, 24 h) y se trataron con la FEF (23.0 y 35.0 $\mu\text{g/ml}$). Se usó dexametasona (1.8 $\mu\text{g/ml}$) como fármaco de referencia. A partir de los lisados celulares se determinaron las expresiones de iNOS y COX-2 mediante el análisis de western blot. Las imágenes inferiores son representativas de cinco experimentos con resultados similares. B: blanco (células sin estimulación ni tratamiento); C: control (células estimuladas con LPS y sin tratamiento). Los gráficos de barras superiores son resultado del análisis densitométrico de todas las imágenes obtenidas; representan el % de expresión de iNOS (izquierda) y COX-2 (derecha) expresado como la media \pm S.E.M; **** $p < 0.0001$ respecto al control.

V.3.5. Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de Polimerasa de iNOS

El efecto de los *ent*-kauranos sobre la transcripción del RNA_m de iNOS se determinó en macrófagos RAW 264.7 pretratados con **1** a **4** durante 1 h en concentración 5.0 μM y estimulados con LPS (Cf: 1 μg/ml) durante 8 h, por la técnica RT-PCR. La cuantificación de DNA_c amplificado a partir de RNA_m de iNOS se realizó normalizando los valores obtenidos respecto a β-actina, y expresando estos valores como porcentajes respecto al control. Todos los compuestos inhiben la producción de RNA_m de manera dosis dependiente como muestran el gráfico de barras y la imagen en la **Figura 11**.

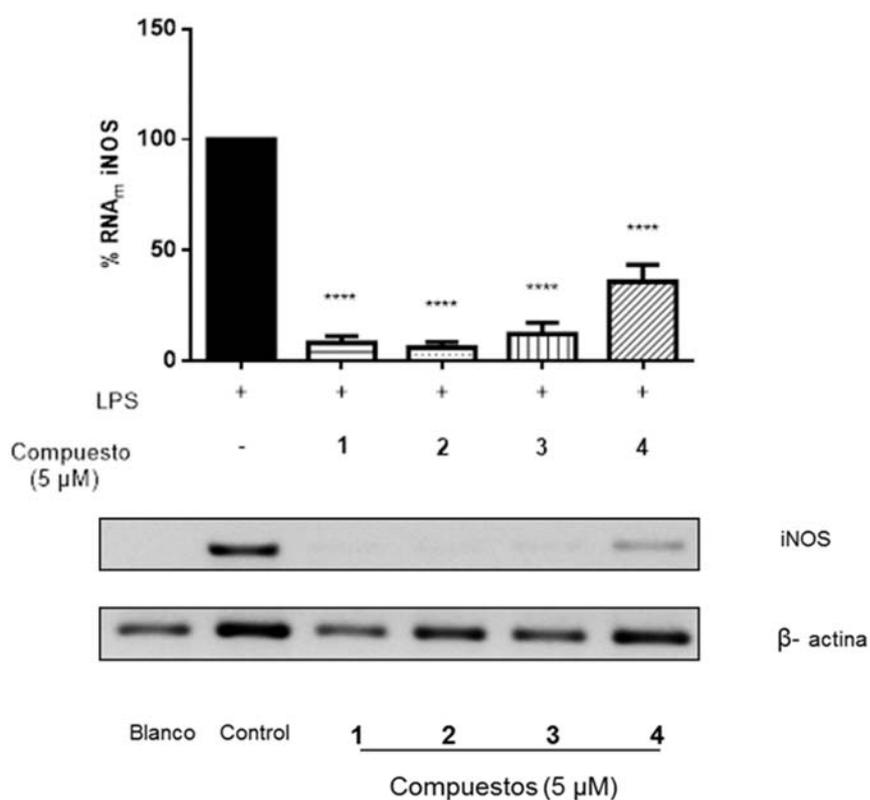


Figura 11. Efecto de **1**, **2**, **3** y **4** a 5.0 μM sobre la expresión de mRNA de iNOS en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (1 μg/ml, 8 h) detectado con ayuda de la técnica de RT-PCR. La imagen inferior es representativa de cinco experimentos con resultados similares. B: blanco (células sin estimulación ni tratamiento); C: control (células estimuladas con LPS y sin tratamiento). El gráfico de barras superior es resultado del análisis densitométrico de todas las imágenes obtenidas; representa el % de expresión de mRNA de iNOS expresado como la media ± S.E.M. **** p < 0.0001 respecto al control.

V.3.6. Determinación de la cinética de degradación de I κ B por Western blot

La degradación de I κ B se evaluó en lisados de células RAW 264.7 pretratadas durante 1 h con los compuestos **1** a **4** en concentración 5.0 μ M y estimuladas con LPS (Cf: 1 μ g/ml) durante 10, 30 y 60 min, mediante la técnica de western blot. La **Figura 12** muestra que los cuatro compuestos retardan la degradación de I κ B inducida por LPS.

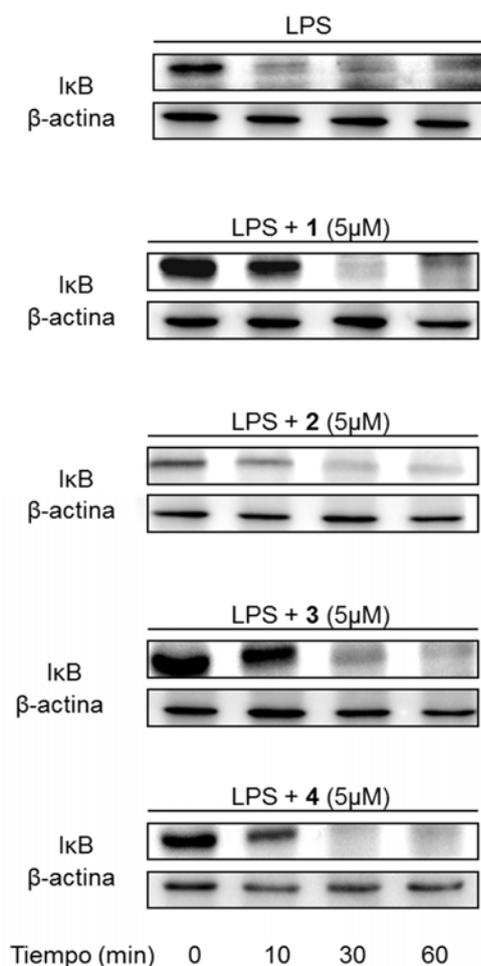


Figura 12. Efecto de los *ent*-kauranos sobre la degradación de I κ B en células RAW 264.7. Las células fueron estimuladas con LPS solamente (1 μ g/ml, grupo control), o tratadas con los compuestos (5.0 μ M) y LPS (1 μ g/ml) durante 0, 10, 30, y 60 min. La degradación de I κ B fue detectada con ayuda de la técnica de western blot con anticuerpo contra I κ B. Las imágenes son representativas de tres experimentos; representan la degradación de I κ B (en extracto celular) dependiente del tiempo después de la estimulación. La presencia de I κ B en el citoplasma celular es claramente más alta en las células tratadas versus el control a 10 min con una posterior degradación en todos los casos.

V.3.7 Determinación de la cinética de translocación de p65 por Western blot

La translocación de p65 desde el citosol al núcleo se evaluó en extractos nucleares de células RAW 264.7 pretratadas durante 1 h con los compuestos **1** a **4** en concentración 5.0 μ M y estimuladas con LPS (Cf: 1 μ g/ml) durante 10, 30 y 60 min, mediante la técnica de western

blot. La **Figura 13** muestra que todos los compuestos inhiben la translocación de p65 al núcleo.

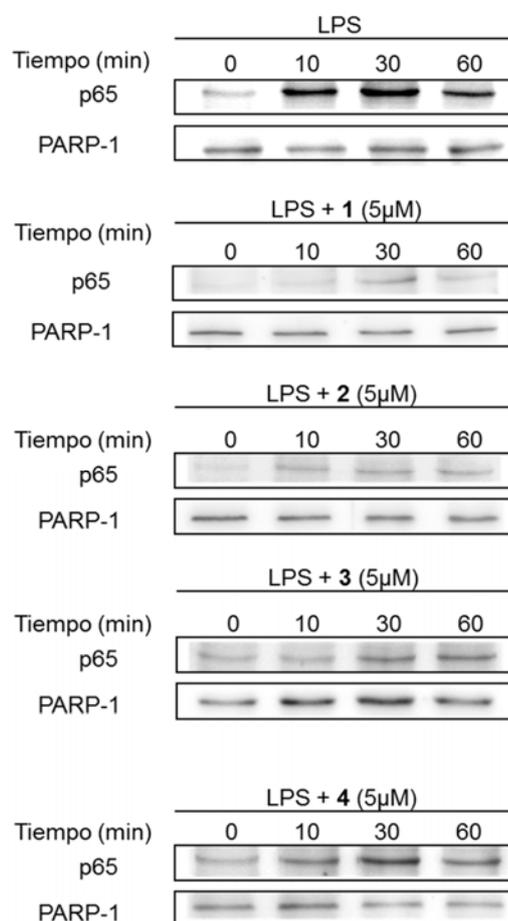


Figura 13. Efecto de los *ent*-kauranos sobre la translocación de p65 en células RAW 264.7. Las células fueron estimuladas con LPS solamente (1 µg/ml, grupo control), o tratadas con los compuestos (5.0 µM) y LPS (1 µg/ml) durante 0, 10, 30, y 60 min. Se obtuvieron los extractos nucleares y la translocación nuclear de p65 fue detectada con ayuda de la técnica de western blot con anticuerpo contra p65. Las imágenes son representativas de tres experimentos. La presencia de p65 en el núcleo es claramente menor en las células tratadas (filas 2 a 5) mientras que en el control su presencia es elevada (fila 1).

V.3.8. Localización de p65 por inmunocitoquímica

Para confirmar el efecto inhibitorio de los *ent*-kauranos sobre la traslocación de p65 al núcleo se realizó un ensayo inmunocitoquímico en macrófagos RAW 264.7 pretratados durante 1 h con los compuestos **1** a **4** en concentración 1.0 µM y estimulados con LPS (Cf: 1 µg/ml) durante 30 minutos. Luego de fijados, incubados con anticuerpo primario contra p65 y secundario conjugado con un fluorocromo de fluorescencia verde, y sus núcleos teñidos con DAPI, se obtuvieron las imágenes por microscopía de fluorescencia (**Figura 14**).

En las células blanco (no estimuladas con LPS ni tratadas con los compuestos) se observa p65 en el citoplasma, mientras que en las células estimuladas (control) deja de observarse la fluorescencia en el citoplasma, confirmando su translocación al núcleo. El tratamiento de las células con los cuatro compuestos inhibe la translocación de p65, permaneciendo en el citoplasma.

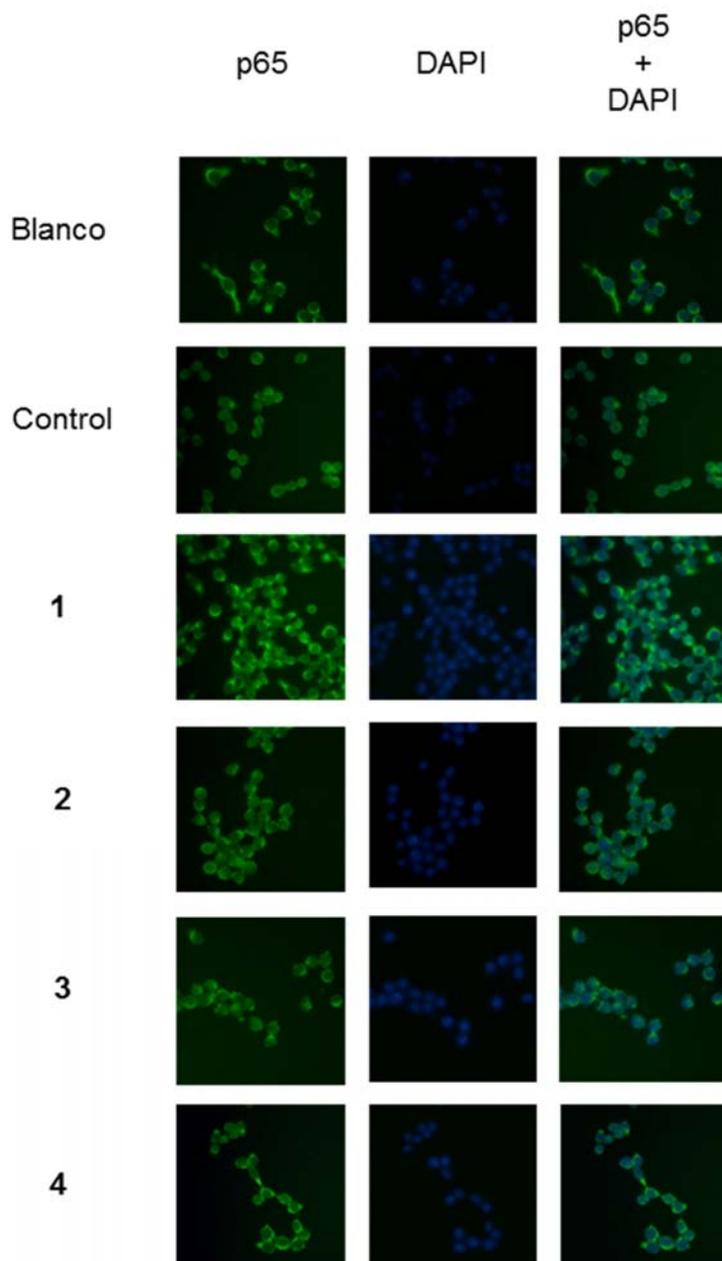


Figura 14.

Inmunofluorescencia de p65. Células RAW 264.7 fueron estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min) y pretratadas con los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** (1.0 μM) por 1 h. Las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpo contra p65 y DAPI. B: Blanco (células sin estimulación ni tratamiento); C: Control (células estimuladas con LPS); **1**, **2**, **3** y **4** (células tratadas con los compuestos). La distribución de NF- κB p65 en las células fue reconocida a través de la fluorescencia verde concentrada en el citoplasma (primera columna, filas B y **1**, **2**, **3** y **4**), mientras que en C no se percibe fluorescencia. En la segunda columna (DAPI) el color azul corresponde al DNA coloreado y representa a los núcleos). La columna tres (p65 + DAPI) es una superposición de las dos imágenes previas en la cual, la intensa fluorescencia verde debido a p65 se encuentra fuera de los núcleos (filas B y **1**, **2**, **3** y **4**) mientras que en C la fluorescencia no es percibida porque p65 está principalmente localizado en los núcleos.

V.3.9. Evaluación de la translocación de NF- κ B por EMSA

También para evaluar el efecto de los *ent*-kauranos sobre la translocación de NF- κ B, se trataron células RAW 264.7 con los compuestos **1** a **4** en concentración 1.0 μ M durante 1 h, posteriormente se estimularon con LPS (Cf: 1 μ g/ml) y luego de 1 h de incubación se procedió a la evaluación del extracto proteico nuclear por EMSA. En la **Figura 15** se observa que la activación de NF- κ B resulta claramente disminuida por los compuestos **1** a **3**, mientras que **4** no ejerce efecto.

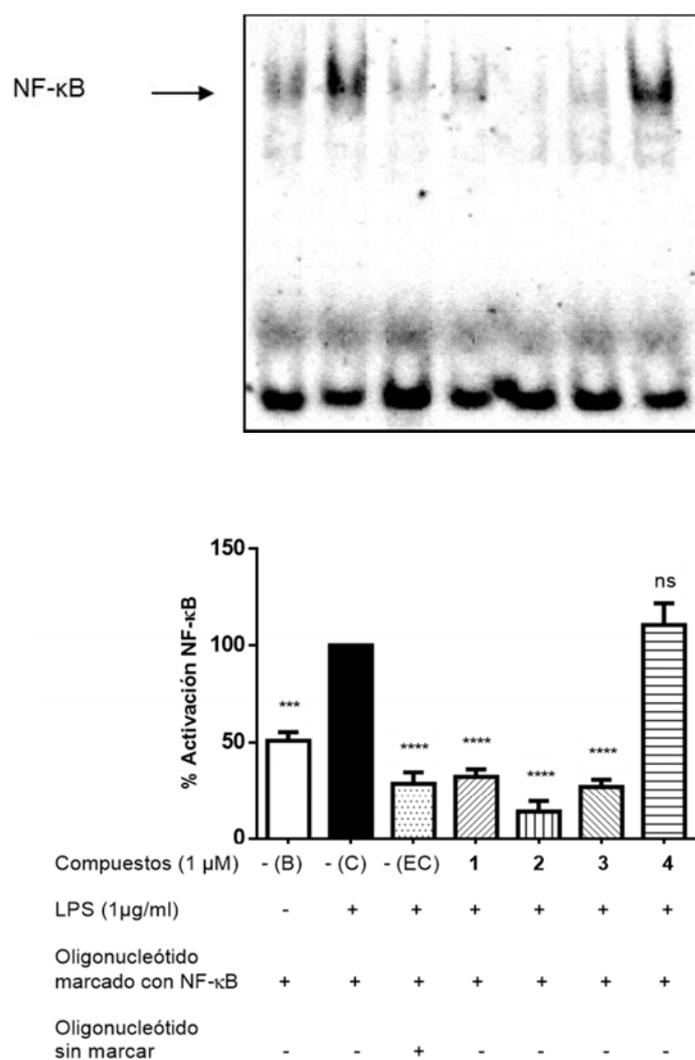


Figura 15. Efecto de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** sobre NF- κ B en RAW 264.7 estimuladas con LPS detectado mediante el ensayo de EMSA. La figura superior es la imagen obtenida en uno de los ensayos; la inferior, el gráfico de barras resultante del análisis densitométrico de todas las imágenes obtenidas. Las células fueron estimuladas con LPS (1 μ g/ml, 1 h) en ausencia (grupos B, C y EC) o presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** (1.0 μ M). La calle B corresponde a la siembra de extracto nuclear de células sin tratamiento ni estímulo (blanco), la calle C corresponde a la siembra de extracto nuclear de células estimuladas con LPS (control) y la calle EC corresponde a la siembra de extracto nuclear de células estimuladas con LPS y adicionado de oligonucleótido sin marcar en exceso (ensayo de competición). Las calles 1 a 4 corresponden a extractos nucleares de células tratadas con los compuestos y estimuladas con LPS. El gráfico de barras representa el porcentaje de activación de NF- κ B para cada grupo expresado como la media \pm S.E.M para n = 3; los valores fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control para ** p < 0.01 y **** p < 0.0001. ns (no significativo).

V.3.10. Expresión transitoria del gen que se halla bajo regulación de NF- κ B

Con el fin de evaluar el efecto que ejercen los *ent*-kauranos sobre la expresión del gen controlado por NF- κ B, células RAW 264.7 se transfectaron transitoriamente con el gen reportero de luciferasa dependiente de NF- κ B, se trataron con los compuestos **1** a **4** en concentraciones 5.0, 1.0 y 0.1 μ M durante 1 h y se estimularon con LPS (Cf: 1 μ g/ml) durante 18 h. En las células estimuladas con LPS (control), se observa un claro aumento de la expresión de luciferasa respecto al nivel basal (células blanco), y también se observa que los cuatro compuestos reducen su expresión de manera dosis dependiente (**Figura 16**)

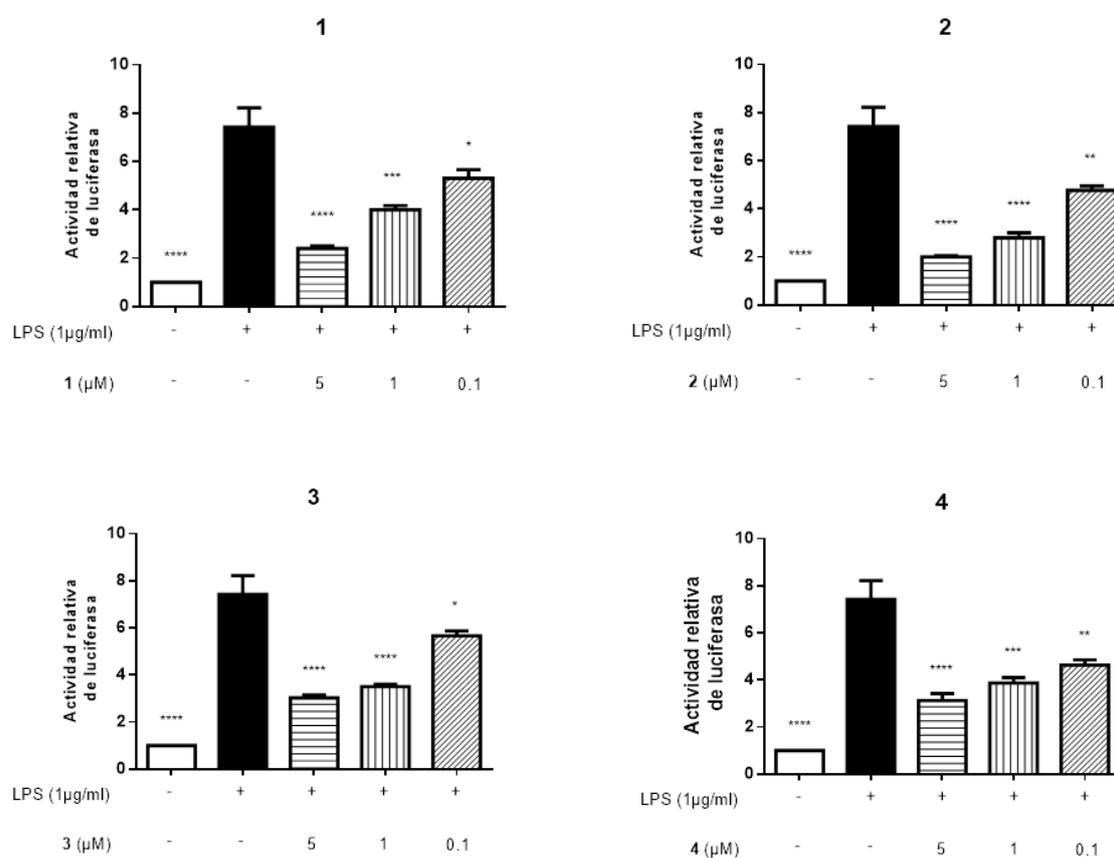


Figura 16. Efecto de los *ent*-kauranos (5.0, 1.0, y 0.1 μ M) sobre la actividad transcripcional de NF- κ B en células RAW 264.7 estimuladas y transitoriamente transfectadas con el gen reportero de luciferasa. Las células fueron pretratadas con los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** y estimuladas con LPS por 18 h. La actividad transcripcional fue detectada a través de la actividad luciferasa normalizada respecto a la actividad de TK-*Renilla* y expresada en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm S.E.M de la actividad relativa de luciferasa de tres experimentos. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos respecto al control (células estimuladas y sin tratamientos) para $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Respecto a los *ent*-kauranos

En esta tesis se evaluó el efecto de 4 *ent*-kauranos sobre algunas moléculas claves implicadas en la respuesta inflamatoria, pertenecientes a las categorías de mediadores, enzimas o factores de transcripción. Si bien es cierto, que una gran variedad de ellos están implicados en el proceso inflamatorio, los estudios llevados a cabo en esta tesis centran el foco de atención en NO, iNOS y NF- κ B.

Los 4 *ent*-kauranos: xerophilusin A, xerophilusin B, longikaurin B y xerophilusin F (Figura 1) habían sido aislados previamente a partir de hojas de *I. xerophilus* por Sun y colaboradores (Hou *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b).

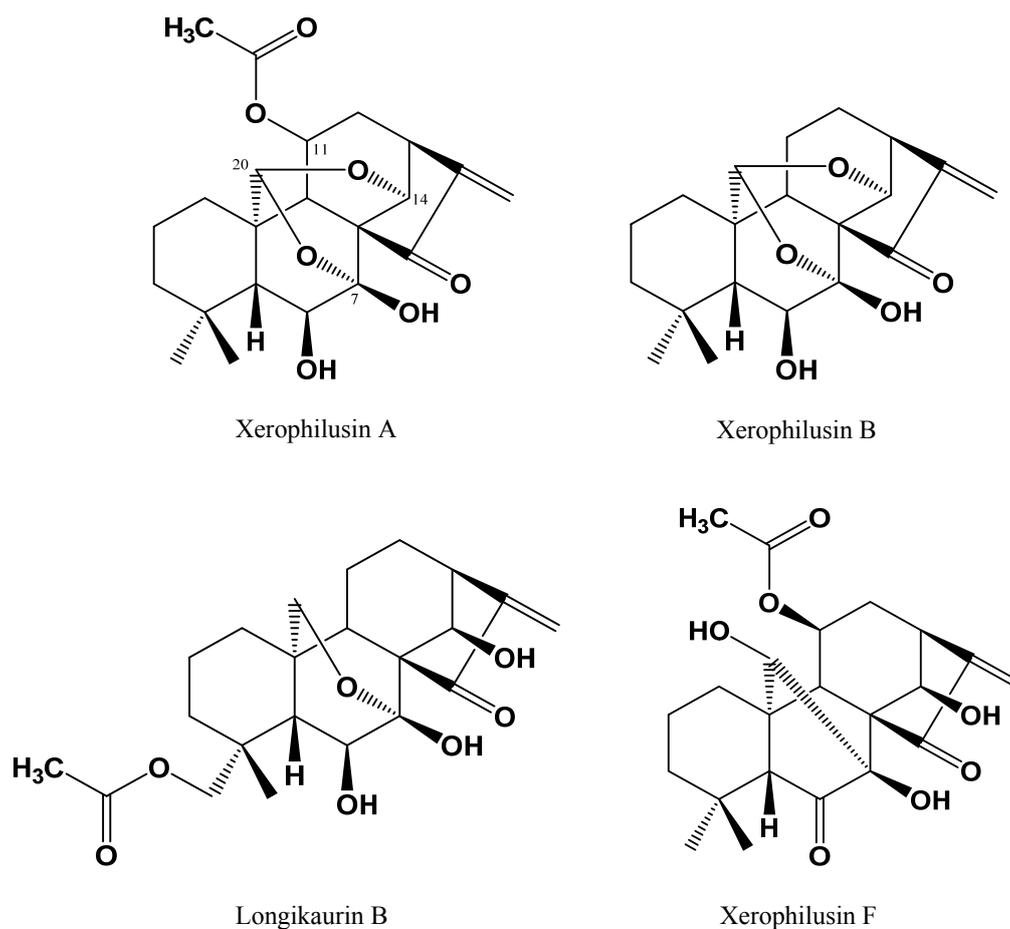


Figura 1. Estructuras químicas de los 4 *ent*-kauranos estudiados en esta tesis.

Desde 1976, más de 60 especies del género *Isodon* fueron investigadas fitoquímicamente, y se aislaron y caracterizaron más de 1000 terpenoides, principalmente *ent*-kauranoides. En general estos compuestos han atraído la atención debido a su potencial aplicación como agentes antitumorales (Yang *et al.*, 2016).

Los primeros estudios evaluaban su potencial antitumoral mediante ensayos de citotoxicidad, en su mayoría, experimentos *in vitro* sobre distintas líneas celulares humanas de cáncer; mientras que estudios más recientes, evalúan además, la actividad telomerasa y la inducción a apoptosis.

En la actualidad, es generalmente aceptado que el efecto citotóxico de los diterpenoides con esqueleto *ent*-kaurano es debido a que son responsables del aumento de ROS, y este aumento es desencadenante de la apoptosis celular (Lin *et al.*, 2015).

En ensayos de citotoxicidad, xerophilusin A y xerophilusin F mostraron significativa actividad contra células humanas de leucemia mieloide crónica K562, leucemia promielocítica HL-60 y cáncer gástrico MKN-28, y xerophilusin F inhibió además el crecimiento de células humanas de cáncer hepático HepG2 (Hou *et al.*, 2000a; Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

El efecto de xerophilusin B se estimó sobre un número más amplio de líneas celulares. Además de las mencionadas en el párrafo anterior fueron utilizadas otras líneas celulares humanas de cáncer gástrico: MKN-45, y de carcinoma de hígado: CA, SMMC-7721 y BEL-7402, células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A-549, células de carcinoma de colon humano: HCT, HT-29 y SW480, células humanas de adenocarcinoma de mama MCF-7 y células de adenocarcinoma de ovario humano SK-OV-3. Todos los resultados demuestran que inhibe la proliferación de las células tumorales *in vitro* (Hou *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011a, 2011b).

Xerophilusin B también exhibió efecto antiproliferativo sobre células escamosas de carcinoma de esófago ESCC de manera dosis y tiempo dependiente, induciendo arresto del ciclo celular y promoviendo la apoptosis de las células cancerígenas, con baja toxicidad hacia células normales murinas y humanas. Además, inhibió el crecimiento de tumor de esófago humano, injertado en ratón, sin efectos adversos significativos (Yao *et al.*, 2015). Otra

investigación con células K562 demuestra que inhibe la actividad telomerasa y promueve la apoptosis de las células cancerígenas (Cosan y Soyocak, 2012).

Longikaurin B cuando fue aislado por primera vez, a partir de *Rabdosia longituba*, fue evaluado como antibacteriano, y mostró ser activo contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Fujita *et al.*, 1980). También mostró fuerte actividad antibacteriana contra microorganismos cariogénicos y periodontopatógenos (Osawa *et al.*, 1994). Y en los ensayos de citotoxicidad inhibió el crecimiento de células K562, MKN-28, MKN-45, HepG2, HL-60 y HCT (Hou *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2007).

Hasta el año 2003, no existen trabajos que investiguen a los *ent*-kauranos como antiinflamatorios, a pesar de ser constituyentes comunes del género *Isodon*, con muchas especies con reconocido uso tradicional como antiinflamatorias (Sun *et al.*, 2006). A partir del año 1986, con el descubrimiento del factor de transcripción NF- κ B y las investigaciones posteriores que lo señalaron como principal regulador implicado en varias enfermedades humanas, se convirtió en el blanco de investigaciones de fármacos anticancerígenos y antiinflamatorios (Baldwin, 2001; Salminen *et al.*, 2008). NF- κ B regula la expresión de genes inducibles que están implicados en el desarrollo de tumores, la angiogénesis y la metástasis (Leung *et al.*, 2005) y tiene un papel esencial en la respuesta inflamatoria regulando la transcripción de genes que codifican citocinas, receptores de citocinas, moléculas de adhesión, proteínas quimioatrayentes, reguladores de crecimiento y enzimas inducibles como iNOS y COX-2, como se vio más ampliamente en esta tesis (Baldwin, 2001; Bremner y Heinrich, 2002).

El efecto de *ent*-kauranos aislados de *Croton tonkinensis*, sobre la activación de NF- κ B y la producción de NO inducidas por LPS en macrófagos RAW 264.7, fue estudiada por Giang *et al.* (2003) quienes informan que esos *ent*-kauranos inhiben la activación de NF- κ B y reducen marcadamente la producción de NO de manera concentración dependiente.

De otros *ent*-kauranos, aislados ya de especies del género *Isodon*, *I. rubescens* e *I. eriocalyx*, se informa que interfieren directamente con la unión de NF- κ B a la secuencia consenso del DNA y que algunos tienen un impacto adicional sobre la translocación de NF- κ B hacia el núcleo (Leung *et al.*; 2005, 2006).

Dos nuevos *ent*-kauranos, aislados ahora de *I. xerophilus*, mostraron inhibir la producción de NO e IL-1 β y disminuir la producción de TNF- α en células RAW 264.7 estimuladas con LPS o LPS y PHA (de *phytohemagglutinin* en inglés) (Weng *et al.*, 2007).

De los *ent*-kauranos estudiados en esta tesis, solo longikaurin B fue evaluado previamente en su efecto sobre la producción de NO, en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, exhibiendo un valor de IC₅₀ (μ M) de 0.90 ± 0.08 , en un trabajo en el que se hace expresa referencia sobre la importancia en enfermedades inflamatorias que tiene la excesiva producción de NO por iNOS, sugiriendo que la inhibición de NO en macrófagos podría ser un beneficio terapéutico en condiciones inflamatorias (Hong *et al.*, 2008).

En macrófagos murinos RAW 264.7, la sola estimulación con LPS, induce la expresión de citocinas y mediadores inflamatorios, por lo cual constituye un modelo útil para evaluar potenciales reguladores de la respuesta inflamatoria (Maeda *et al.*, 2013). En esta investigación, en primer término, se examinó el efecto citotóxico *in vitro* de xerophilusin A, xerophilusin B, longikaurin B y xerophilusin F en macrófagos de ratón RAW 264.7 mediante el ensayo de viabilidad celular, a fin de determinar el rango de concentraciones de los compuestos, aptas para ser ensayadas en los siguientes protocolos experimentales empleados.

La viabilidad celular disminuyó un 50 % para concentraciones de 11.25 ± 0.03 y 10.14 ± 0.25 μ M de xerophilusin A y B respectivamente, por lo que resultaron más tóxicos que longikaurin B y xerophilusin F cuyas concentraciones de inhibición media resultaron ser 44.80 ± 0.27 y 52.39 ± 0.15 μ M. Sin embargo los cuatro compuestos, hasta concentraciones de 5.00 μ M, mostraron una viabilidad celular mayor al 97.5%, concentración que fue elegida como límite superior a ser evaluada en los distintos protocolos.

En segundo lugar, dado que la generación de altos niveles de NO producido por iNOS en macrófagos, juega un papel crucial en los procesos inflamatorios, y su producción en exceso asociada a inflamación aguda y crónica, causa daño en los tejidos (Chen *et al.*, 2013; Maeda *et al.*, 2013), se continuó evaluando la capacidad de los 4 *ent*-kauranos de modificar la producción de este mediador inflamatorio.

En nuestro estudio, la producción de NO disminuyó en las células estimuladas con LPS y pretratadas con los compuestos, de manera concentración dependiente. Los valores de IC₅₀

obtenidos fueron $0.60 \pm 0.08 \mu\text{M}$ y $0.22 \pm 0.03 \mu\text{M}$ para xerophilusin A y B respectivamente, $0.43 \pm 0.05 \mu\text{M}$ para longikaurin B y $0.67 \pm 0.09 \mu\text{M}$ para xerophilusin F.

Dado que iNOS es la enzima responsable en producir grandes cantidades de NO en macrófagos estimulados (McNeill *et al.*, 2015), la búsqueda de compuestos que la inhiban es una estrategia útil en el descubrimiento de nuevas drogas antiinflamatorias (Chen y Zhang, 2014). En el experimento anterior, la disminución observada en los niveles de NO, pudo deberse a una disminución en la actividad de iNOS o a una disminución en la expresión de la misma.

Para evaluar si los compuestos afectan la expresión de iNOS, se realizó la cuantificación de la enzima por el método de WB y se demostró que todos los compuestos evaluados disminuyen la expresión de iNOS de manera dosis dependiente. Mientras que a $5 \mu\text{M}$ los cuatro compuestos suprimen la expresión de iNOS, a $1 \mu\text{M}$ xerophilusin A y B resultaron ser más activos que longikaurin B y xerophilusin F.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede considerar que la disminución en la producción de NO estaría asociada a una disminución en la expresión de iNOS.

Además, se examinó el efecto de los cuatro compuestos sobre la expresión de mRNA de iNOS por RT-PCR en las mismas células. Xerophilusin A y B y longikaurin B inhibieron completamente la expresión del mRNA a $5 \mu\text{M}$, mientras que xerophilusin F atenuó considerablemente su expresión.

Si los valores de mRNA no se hubiesen visto afectados por los tratamientos, se podría haber postulado que los compuestos estarían interfiriendo con moléculas asociadas a la etapa de traducción, es decir, la síntesis proteica a partir del mRNA. Sin embargo, los resultados muestran que los niveles de concentración de mRNA de iNOS son cero para los tratamientos con xerophilusin A, xerophilusin B y longikaurin B, y muy bajos para xerophilusin F, lo que conduce a sospechar que la etapa de transcripción, la síntesis de mRNA a partir de DNA en el núcleo, no está ocurriendo.

Como se ha explicado en esta tesis, el gen que expresa la síntesis de iNOS, como la de otras enzimas y proteínas vinculadas a la respuesta inflamatoria, es un gen inducible, es decir que se expresa bajo ciertas condiciones, regulado por factores de transcripción. Por lo expuesto hasta aquí, se continuó entonces la investigación, centrando el foco de atención en

uno de los factores de transcripción responsables de la regulación de la expresión de iNOS, NF- κ B.

NF- κ B es una proteína dimérica, cuya forma más habitual es el heterodímero constituido por las subunidades p65 y p50, y es masivamente reconocido como el regulador transcripcional principal de la expresión de genes inflamatorios. Muchos de ellos contienen sitios de unión específicos para el factor de transcripción NF- κ B en sus regiones promotoras. Cuando se activa este factor de transcripción, migra al núcleo e induce la expresión de genes que codifican para proteínas y enzimas proinflamatorias, entre ellas iNOS. La activación de NF- κ B, implica la activación del complejo cinasa IKK cuando la célula es expuesta a un estímulo inflamatorio, entonces la cascada de activación de cinasas, conduce a la fosforilación de I κ B. I κ B es un complejo de proteínas reguladoras que cuando está unido al heterodímero NF- κ B, lo mantiene inactivo, anclado al citoplasma; pero cuando I κ B es fosforilado, es seguidamente poliubiquitinado y degradado por el proteosoma, entonces el heterodímero liberado, se mueve hacia el núcleo y se une a sus sitios específicos en el DNA activando la transcripción de los mRNA de los genes que se encuentran bajo su regulación (Baldwin, 2001; Laveti *et al.*, 2013).

Estas etapas principales en la activación del NF- κ B, resultan en posibles sitios a lo largo de la cascada de señalización, susceptibles de ser modificados por los compuestos estudiados. En base a estas consideraciones, se continuó examinando el efecto de los 4 *ent-*kauranos sobre la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B, la translocación de NF- κ B al núcleo y su unión al DNA, y la degradación de I κ B.

La actividad transcripcional se investigó mediante el ensayo del gen reportero de luciferasa; para el cual los macrófagos fueron transfectados transitoriamente con un plásmido, que contiene un gen que codifica para la expresión de la enzima luciferasa, bajo la regulación de un promotor de NF- κ B. Este arreglo permite monitorizar la actividad promotora que controla la expresión génica. En nuestro estudio, los 4 compuestos disminuyeron la actividad luciferasa de manera dosis dependiente, es decir, que los compuestos inhiben la expresión de los genes que se hallan bajo regulación de NF- κ B. Este resultado pone de manifiesto dos posibilidades, una de ellas, que el NF- κ B no ingrese al núcleo; la otra, que se transloque pero que no logre unirse a su promotor. Y además, se

correlaciona con los resultados observados anteriormente sobre la producción de NO e iNOS: si la expresión génica está inhibida, no hay síntesis de iNOS y no hay producción de NO.

Para dilucidar las dos posibilidades mencionadas en el párrafo anterior, se utilizaron tres ensayos diferentes que ponen de manifiesto la translocación del factor nuclear: EMSA, inmunocitoquímica, y WB para cuantificar p65 e I κ B.

En los extractos nucleares proteicos de células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con los compuestos xerophilusin A y B y longikaurin B, el ensayo de cambio de movilidad electroforética, demuestra que NF- κ B no está presente en el núcleo, de modo que estos compuestos evitan la translocación; mientras que xerophilusin F no afecta esta etapa. La presencia de NF- κ B en el núcleo se hace evidente por el retardo de la banda del oligonucleótido marcado cuando interacciona con el factor nuclear.

Hasta aquí, los resultados de xerophilusin F en los ensayos de luciferasa y EMSA, parecerían indicar que este compuesto no inhibe la activación de NF- κ B, pero sí interfiere en la unión a su región promotora. Sin embargo, los otros 3 *ent*-kauranos, sí estarían inhibiendo la activación de NF- κ B.

El ensayo de inmunocitoquímica pone de manifiesto la localización del factor nuclear *in situ*. Los resultados muestran que en las células RAW 264.7 tratadas con los 4 compuestos y estimuladas con LPS, el NF- κ B se localiza en el citoplasma. Mientras que para xerophilusin A y B y longikaurin B, los resultados de este ensayo son coherentes con los obtenidos para EMSA, el comportamiento de xerophilusin F es contradictorio. Éste compuesto, en éste ensayo, se estaría comportando como un inhibidor de la activación de NF- κ B. En ambos ensayos, los macrófagos fueron pretratados durante 1h con los compuestos a concentraciones 1 μ M; sin embargo, el tiempo de estímulo con LPS (1 μ g/ml) fue de 1 h para EMSA y de 30 min para el ensayo de inmunocitoquímica, lo cual sugiere que probablemente el comportamiento de xerophilusin F dependa del tiempo de estimulación: a mayor tiempo de estímulo, menor efectividad.

El último experimento realizado para la localización del factor nuclear, consistió en la cuantificación por WB de p65 en extractos proteicos nucleares de macrófagos, pretratados con los compuestos a distintos tiempos de estímulo con LPS: 0, 10, 30 y 60 min. Los resultados en las células control (que sólo recibieron LPS) demuestran que a 10 min de

estímulo la translocación de NF- κ B al núcleo se hace evidente, que es máxima a los 30 min, y que a los 60 min, los niveles de NF- κ B comienzan a disminuir. También, que todos los compuestos inhiben en distintos grados la translocación del factor nuclear, y que xerophilusin F, a 30 min de estímulo, manifiesta el menor efecto inhibitorio.

Finalmente, si los 4 compuestos inhiben la activación de NF- κ B, significa que deberían inhibir la degradación de I κ B, la proteína que mantiene al factor nuclear anclado al citoplasma. Se cuantificó I κ B por WB en extractos proteicos celulares de macrófagos estimulados con LPS a los mismos tiempos del ensayo anterior y pretratados con los compuestos. A tiempo 0, todos los extractos muestran la presencia de I κ B; en las células control, ya a 10 min de estímulo, la degradación fue total; sin embargo, a este mismo tiempo, todos los *ent*-kauranos inhiben fuertemente la degradación de I κ B, aunque xerophilusin F, otra vez, demuestra ser el menos efectivo.

Teniendo en cuenta que el ensayo de viabilidad celular, señalaba a xerophilusin F como el menos tóxico de los 4 *ent*-kauranos estudiados, tal vez a concentraciones más elevadas pero que todavía no resulten tóxica, el compuesto manifieste mayor efectividad.

Mediante el desarrollo del proceso experimental con los diterpenoides *ent*-kauranos, la hipótesis formulada en esta tesis pudo ser verificada, habiéndose demostrado el efecto modulador, sobre distintos componentes de la cascada de señalización de NF- κ B, que ejercen estos compuestos.

Por lo expuesto, este estudio aporta un fundamento científico al empleo tradicional en el tratamiento antiinflamatorio de *I. xerophilus*, especie en la que los *ent*-kauranos constituyen sus principales componentes.

VI.2. Relativa a la fracción enriquecida en flavonoides

En el presente trabajo, se obtuvo a partir de un extracto en butanol de raíces de *C. tayuya*, una fracción enriquecida en flavonoides, y se determinó la identidad de los compuestos que constituyen esa fracción. Luego fueron utilizados modelos de inflamación aguda y crónica para evaluar su efecto antiinflamatorio *in vivo*, y ensayos *in vitro* para investigar su influencia sobre la expresión de mediadores y enzimas proinflamatorios.

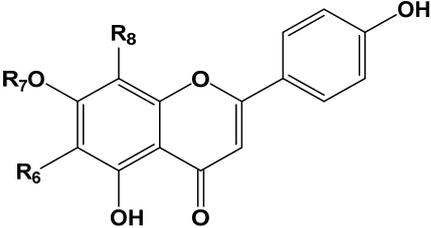
El extracto en butanol fue previamente elaborado por Ríos y colaboradores. Estos investigadores comunicaron que exhibió una fuerte actividad antiinflamatoria administrado por vía intraperitoneal, inhibiendo el edema plantar inducido por carragenina en pata de ratón, con una $ED_{50} = 427.5 \pm 0.6$ mg/Kg y una $LD_{50} > 2000$ mg/Kg. También informaron el aislamiento de dos flavonas a partir de este extracto, identificadas como vicenin-2 y spinosin, que sometidas al mismo ensayo que el extracto, mostraron una $ED_{50} = 148$ y 150 mg/Kg respectivamente, siendo las $LD_{50} > 2000$ mg/Kg para ambas (Ríos *et al.*, 1990).

El modelo de edema empleado por estos autores es un modelo utilizado para la determinación de agentes antiinflamatorios no esteroideos. Es un evento bifásico en el cual la fase inicial es atribuida a la liberación de histamina y serotonina, con un pico máximo a las 3 h producido por la liberación de sustancias tipo cininas, especialmente bradicinina; y la segunda fase, que se debe a la liberación de prostaglandinas y proteasas, es sensible a los fármacos antiinflamatorios más efectivos clínicamente (Küpeli *et al.*, 2004).

En esta tesis, a partir del extracto en butanol, mediante cromatografía en columna con sílica, se obtuvo una fracción que sometida a cromatografía en capa fina en sílica y HPLC, reveló la presencia de 4 flavonoides identificados por comparación de sus datos cromatográficos con los informados por Bauer y colaboradores (1985), como vicenin-2, spinosin, isovitexin y swertisin. Sin embargo, el cromatograma de la misma fracción, sometida a cromatografía en capa fina en poliamida, dejó ver la presencia de un compuesto más. Para determinar su identidad, la fracción fue expuesta a una cromatografía en columna de vacío con poliamida. Esta nueva separación resultó en un compuesto puro que fue identificado mediante ^{13}C NMR por comparación con datos bibliográficos (Agrawal, 1989) como swertisin; y una nueva fracción con dos componentes, uno de ellos el reciente identificado swertisin y el otro identificado de la mezcla como isoswertisin mediante comparación con datos de ^{13}C NMR publicados previamente (Agrawal, 1989).

De este modo, la llamada fracción enriquecida en flavonoides (FEF), es una mezcla constituida por vicenin-2, spinosin, isovitexin, swertisin e isoswertisin, en la que vicenin-2 es el componente mayoritario como puede observarse del cromatograma obtenido por HPLC. Todos ellos son heterósidos, más concretamente C-glucósidos de la apigenina, un flavonoide que pertenece al grupo de las flavonas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estructura química de los flavonoides que constituyen la FEF

Apigenina (R ₆ , R ₇ , R ₈ = H)	R ₆	R ₇	R ₈	Nombre
	glucosa	H	H	isovitexin
	glucosa	H	glucosa	vicenin-2
	glucosa	CH ₃	H	swertisin
	H	CH ₃	glucosa	isoswertisin
	glucosa-glucosa	CH ₃	H	spinosin

Muchas son las investigaciones que demuestran que los flavonoides son una alternativa posible a las moléculas tradicionales utilizadas como agentes antiinflamatorios. Entre sus actividades biológicas se incluye la modulación de diversas fases del proceso inflamatorio, desde la transcripción y expresión de genes hasta la inhibición de la actividad enzimática y la eliminación de especies reactivas, asociada esta última a su actividad antioxidante. Y a pesar de la existencia de muchos informes relativos a la actividad antiinflamatoria de los flavonoides en general, son pocos los relacionados con esta actividad vinculada a los C-glicosilflavonoides (González *et al.*, 2011).

La apigenina, el aglicón que constituye el núcleo fundamental de los C-glicosilflavonoides que componen la mezcla estudiada, mostró ser efectiva en modelos experimentales de asma (Yano *et al.*, 2006, 2007) y proteger contra shock inducido por LPS o estimulación inmune en modelos experimentales animales (Nicholas *et al.*, 2007). Por otro lado, bloqueó iNOS y COX y la adherencia endotelial de monocitos por disminución de VCAM1, ICAM1 y E-selectina (Lee *et al.*, 2007a). También inhibió la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 y la actividad de COX-2 (Lee *et al.*, 2010). Y en estudios de relación estructura actividad, sobre la inhibición en la producción de PGE₂ en macrófagos peritoneales, mostró una potencia comparable a aspirina (Takano-Ishikawa *et al.*, 2006).

En este estudio, la FEF fue evaluada mediante un modelo de inflamación aguda en oreja de ratón, inducida por aplicación tópica de TPA. La aplicación de una dosis única de TPA induce rápidamente un edema que se hace máximo a las 6 h y se resuelve a las 24 h (Young *et al.*, 1983). Éste es un modelo de inflamación poco específico, pero que resulta útil

cuando la medición del edema es la variable principal del ensayo (De Young *et al.*, 1989). En nuestro estudio, la FEF inhibió la formación del edema en un 66%.

Además, la FEF fue ensayada en un modelo de inflamación crónica en oreja de ratón, inducida por aplicaciones tópicas repetidas de TPA; el cual es un modelo más relevante para evaluar potenciales drogas antiinflamatorias, ya que los compuestos a evaluar son aplicados después de que la lesión inflamatoria se ha establecido (Stanley *et al.*, 1991). En este experimento, la FEF redujo el edema en un 37%.

En relación a nuestro estudio, Marrassini y colaboradores investigaron la actividad antiinflamatoria, utilizando el modelo de edema en oreja de ratón por aplicación única de TPA, de un extracto en etanol de *Urtica circularis*, en el que vicenin-2 resultó ser el principal componente; sin embargo en este trabajo, el extracto en etanol no tuvo efecto sobre la formación del edema, pero mostró poseer significativa actividad antiinflamatoria en un modelo de edema en pata de rata inducido por carragenina (Marrassini *et al.*, 2011).

Sridhar y colaboradores demostraron la capacidad de un extracto en metanol de hojas de *Teramnus labialis*, obtenido a través de extracciones sucesivas con solventes de polaridades crecientes, de inhibir la formación del edema en pata de rata inducido por carragenina. De este extracto fue aislado vitexin, el C₈ isómero de isovitexin, que mostró además acción inhibitoria de la enzima 5-LOX (Sridhar *et al.*, 2006).

En otro estudio de fraccionamiento guiado por bioensayo de actividad antiinflamatoria, se aislaron a partir de hojas de *Passiflora edulis* tres componentes principales, entre ellos vicenin-2 y spinosin, quienes mostraron significativo efecto antiinflamatorio, por inhibir la afluencia de neutrófilos en un modelo de pleuritis en ratón inducido por carragenina (Zucolotto *et al.*, 2009).

La comparación entre estudios realizados con flavonoides para establecer una conclusión sólida es limitada, debido a la gran variedad de modelos inflamatorios utilizados y también, cuando no es el caso de un compuesto puro, que es la situación más frecuente, a las composiciones diversas de las mezclas evaluadas.

Además, como puede observarse de la revisión que hacen Talhi y Silva sobre los avances en investigaciones de C-glicosilflavonoides, las referencias respecto a swertisin,

isoswertisin y spinosin son considerablemente menores a las encontradas para isovitexin y vicenin-2 (Talhi y Silva, 2012).

Sin embargo, la principal conclusión de los estudios *in vitro* es que los flavonoides actuarían casi sin excepción como antiinflamatorios; los resultados obtenidos en los diferentes tipos celulares estudiados, ponen en evidencia la disminución de la expresión y/o función de una variedad de mediadores inflamatorios que incluyen eicosanoides, NO, moléculas de adhesión y citocinas (González *et al.*, 2011).

Para los experimentos *in vitro* realizados en esta tesis, se utilizaron macrófagos murinos RAW 264.7, y consistieron en ensayos de citotoxicidad, ensayos de determinación de producción de TNF- α y NO, y ensayos de determinación de niveles de las enzimas inducibles iNOS y COX-2.

Las células mostraron una viabilidad superior al 95% cuando fueron tratadas con concentraciones de 35.0 $\mu\text{g/ml}$ y menores. En consecuencia, definimos esta concentración como límite superior a testear en los ensayos posteriores.

La citocina proinflamatoria TNF- α y el radical libre NO sintetizado por iNOS, son importantes mediadores inflamatorios derivados de macrófagos y están involucrados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Así, el efecto en la producción excesiva de TNF- α y NO es empleado como criterio para evaluar la actividad antiinflamatoria de compuestos (Marrassini *et al.*, 2011). Cuando en nuestro estudio se evaluó el efecto de la FEF sobre estos tres parámetros inflamatorios, la producción de NO resultó inhibida ($41.2 \pm 5.7\%$ a 35.0 $\mu\text{g/ml}$) como también la expresión de iNOS ($98.3 \pm 0.3\%$ a 35.0 $\mu\text{g/ml}$), sin embargo la producción de TNF- α se vio aumentada.

En el trabajo antes mencionado de Marrassini y colaboradores, los investigadores informaron sobre el comportamiento bifásico que ejerce vicenin-2 sobre la producción de TNF- α y NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Mientras que concentraciones bajas (0.01 a 1 $\mu\text{g/ml}$) del flavonoide disminuyen la producción de NO en un 70%, concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ solo lo hacen en un 16% y a partir de 1000 $\mu\text{g/ml}$ la producción de NO es mayor que la del control. En el caso de TNF- α , concentraciones de 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ disminuyen la producción del mediador prácticamente en un 100 %, concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ lo hacen solo en un 40% aproximadamente y

concentraciones elevadas (100 a 1000 $\mu\text{g/ml}$) aumentan la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por encima del valor del control. Se observa de este modo que vicenin-2 a concentraciones altas manifiesta una actividad proinflamatoria (Marrassini *et al.*, 2011); sin embargo, a estas concentraciones, la FEF resultó citotóxica, no haciendo posible la comparación a concentraciones más allá de 35 $\mu\text{g/ml}$.

Por otro lado, Shie *et al.* demostraron que vicenin-2 inhibe la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ y la producción de NO con CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de 4.0 y 2.3 respectivamente (Shie *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, el rango de concentraciones evaluado para la determinación de NO fue de 12.0 a 35.0 $\mu\text{g/ml}$, y para la determinación de $\text{TNF-}\alpha$, concentraciones de 23.0 y 35.0 $\mu\text{g/ml}$. Se podría considerar a partir de comparaciones de nuestro trabajo con los dos anteriormente mencionados, que la presencia de las restantes flavonas en la FEF aumentaría la citotoxicidad respecto a vicenin-2; que suponiendo que el efecto de la FEF se deba principalmente a vicenin-2, su componente mayoritario, los tres estudios no se oponen respecto al comportamiento de los flavonoides sobre los mediadores evaluados en los distintos rangos de concentraciones; y que el flavonoide comenzaría a tener un efecto proinflamatorio respecto a $\text{TNF-}\alpha$ a partir de concentraciones de 23 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente.

La búsqueda de datos sobre valores de citotoxicidad en células RAW 264.7 estimuladas con LPS para isovitexin, swertisin, isoswertisin y spinosin, evaluados como compuestos puros, solo arrojó resultados para isovitexin; Kim y colegas informaron que hasta concentraciones de 43 $\mu\text{g/ml}$ dicha flavona no presenta efecto citotóxico (Kim *et al.*, 1999).

Otro aspecto llamativo es el comportamiento de la FEF sobre NO/iNOS; mientras que a 35.0 $\mu\text{g/ml}$, la expresión de iNOS fue prácticamente abolida ($98.3 \pm 0.3 \%$), la producción de NO fue inhibida de forma moderada $41.2 \pm 5.7 \%$; esta observación podría sugerir que la FEF es capaz de estimular la expresión o actividad *in vitro* de otras isoformas de NOS constitutivas en macrófagos, ejerciendo un comportamiento similar al observado por Olszanecki *et al.* (2002).

Investigaciones llevadas a cabo con isovitexin, mostraron reducción de iNOS/NOS (Lin *et al.*, 2005) y también de $\text{TNF-}\alpha$ en células RAW 264.7 (Huang *et al.*, 2005). Y en el trabajo citado más arriba de Shie y colaboradores, también fue evaluado el efecto de

isovitexin sobre la producción de TNF- α y NO, resultando en la inhibición de los mediadores con CI_{50} de 4.2 y 2.2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

La comparación de los resultados de Shie y colaboradores de las CI_{50} entre las dos flavonas estudiadas, indicaría que la potencia de isovitexin, una mono-*C*-glucosilflavona, es equivalente a la de vicenin-2, una di-*C*-glucosilflavona.

En muchas publicaciones se ha estudiado la relación entre la estructura de los flavonoides y su actividad antioxidante, con referencia a su capacidad para reducir ROS generadas artificialmente en sistemas no biológicos; sin embargo, la relación entre la estructura de los flavonoides y su capacidad para retardar o inhibir mediadores y enzimas inflamatorias, tales como iNOS, LOX, y COX-2 se ha investigado parcialmente (Lee *et al.*, 2010).

Respecto a este tema, estudios QSAR (de *Quantitative Structure-Activity Relationship*, en inglés) sobre el potencial antiinflamatorio de flavonas *C*-glicosiladas mostraron que: las *C*-glicosilflavonas muestran un potencial antiinflamatorio más fuerte que las *O*-glicosilflavonas; la glicosilación en el anillo A mejora la actividad antiinflamatoria; la metoxilación de grupos hidroxilos reduce la actividad antiinflamatoria y que cuanto mayor es la polaridad del sustituyente en el $C_{2'}$, menor es el potencial antiinflamatorio (Xiao *et al.*, 2015).

Además, en relación a los *C*-glicosilflavonoides en general, se encontró que restos glucosilo en C_6 y C_8 mejoran la actividad antiinflamatoria respecto a los aglicones libres, y grupos hidroxilos libres en las posiciones $C_{3'}$ y $C_{4'}$ aumentan la actividad antiinflamatoria (Zeng *et al.*, 2013).

También, las características estructurales definidas hasta ahora para una buena inhibición de la liberación de TNF- α estimulada por LPS son las siguientes: un doble enlace en la posición $C_2=C_3$ y una función oxo en la posición $C_4=O$ del anillo C, y la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones $C_{3'}$ y $C_{4'}$ del anillo B (Ribeiro *et al.*, 2015).

Otro aspecto importante a considerar es la influencia de la glicosilación sobre la absorción de los flavonoides. Los estudios sugieren que los restos azúcares mejoran este parámetro; por ejemplo, se observó que la absorción del aglicón quercetina fue del 24 %, mientras que diferentes heterósidos de quercetina se absorbieron en un 52 % (Prasad *et al.*,

2010). Se sabe que en ratas los glucósidos de quercetina son sustratos del transportador intestinal de glucosa SGLT-1 (de *Sodium-Dependent Glucose Transporter 1*, en inglés), lo que facilita su absorción en el intestino delgado. Esto podría explicar la mejor absorción de los glucósidos de quercetina, comparada con la de su aglicón, en los seres humanos (González *et al.*, 2011).

En relación al efecto general de los flavonoides, distintos autores coinciden en sus revisiones, que consiste en una disminución de la actividad de células mieloides, principalmente macrófagos, que se traduce en una menor expresión de iNOS, COX-2, citocinas proinflamatorias como TNF y otros marcadores (Yuan *et al.*, 2006; González *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015). Aunque contrariamente, también se encuentran reportes donde el efecto de flavonoides resulta en el aumento de la expresión de génica de iNOS y TNF- α (Chiu *et al.*, 2002; Calixto *et al.*, 2004; González *et al.*, 2011).

En atención a otros potentes mediadores de la inflamación, los derivados del ácido araquidónico, COX-2 es una de las enzimas involucrada en su metabolismo. Muchos estudios dan cuenta de la capacidad de los flavonoides de inhibir COX-2, modulando de este modo el metabolismo del ácido araquidónico y atenuando la inflamación (Lee *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la FEF inhibió la expresión de COX-2 en un 50.5 ± 3.6 % a 23.0 $\mu\text{g/ml}$.

En el trabajo de Huang y colaboradores, isovitexin, uno de los componentes de la FEF, redujo la expresión (20% a 26 $\mu\text{g/ml}$) de COX-2 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Huang *et al.*, 2005). Contrariamente, Choi *et al.*, informaron que no inhibió la expresión de la enzima en el mismo modelo experimental (Choi *et al.*, 2014).

Por otro lado, un extracto hidroalcohólico de *Korthalsella japonica*, cuyos componentes principales resultaron ser tres flavonas di-C-glicosiladas, entre ellas vicenin-2, redujo significativamente (75.1 %) la expresión de COX-2 a 100 $\mu\text{g/ml}$, en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Kim *et al.* 2016).

En esta tesis se demuestra que la FEF tiene efecto antiinflamatorio y destaca el papel de las C-glicosilflavonas que lo componen en contribuir a la actividad antiinflamatoria de *C. tayuya*. Tal efecto, estaría mediado por inhibición en la producción de NO y de la expresión de iNOS y COX-2 en macrófagos. Estos resultados verifican la hipótesis formulada.

VII. CONCLUSIONES

A. Para *Isodon xerophilus*

1. La presencia de xeropilusin A, xerophilusin B, longikaurin B y xerophilusin F en *Isodon xerophilus*, es en parte responsable del efecto antiinflamatorio adjudicado por la medicina tradicional china a esta especie vegetal.
2. Los cuatro compuestos inhiben la expresión de iNOS y la consecuente producción de NO.
3. El mecanismo de acción por el cual estos compuestos ejercen su actividad, está relacionado a la modulación de la activación del factor nuclear NF- κ B.
4. Los cuatro *ent*-kauranos retardan la degradación de I κ B, promovida por LPS en macrófagos murinos e inhiben en distinto grado la translocación de NF- κ B al núcleo.
5. Xerophilusin F manifiesta la menor potencia como inhibidor de la degradación de I κ B y de la translocación de NF- κ B, e interfiere además en la unión de NF- κ B a su región promotora en el DNA.

B. Para *Cayaponia tayuya*

1. La fracción enriquecida en flavonoides está constituida por cinco flavonas glicosiladas identificadas como vicenin-2, isovitexin, swertisin, isoswertisin y spinosin.
2. La fracción enriquecida en flavonoides manifiesta actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda y crónica.
3. El efecto antiinflamatorio de la fracción enriquecida en flavonoides está mediado por, al menos, inhibición en la expresión de iNOS y la consiguiente reducción en la producción de NO, e inhibición en la expresión de COX-2.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abad T, McNaughton-Smith G, Fletcher WQ, Echeverri F, Diaz-Peñate R, Tabraue C, Ruiz de Galarreta CM, López-Blanco F, Luis JG. Isolation of (S)-(+)-naproxene from *Musa acuminata*. Inhibitory effect of naproxene and its 7-methoxy isomer on constitutive COX-1 and inducible COX-2. *Planta Medica*. 2000; 66(5): 471-473.
- Abreu Guirado OA, Cuéllar Cuéllar A. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2008; 13(3): versión on-line disponible en internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000300009. Consultado el 07 de junio de 2016.
- Achenbach H, Waibel R, Hefter-Bübl U, Constenla MA. Constituents of *Fevillea cordifolia*: new norcucurbitacin and cucurbitacin glycosides. *Journal of Natural Products*. 1993; 56(9): 1506-1519.
- Adarmes H, Solís JP, Müller A, Galleguillos M. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2009; 41(3): 255-259.
- Agrawal PK. (Ed.), 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Studies in Organic Chemistry, vol. 39. Elsevier, Amsterdam, pp. 326 y 329.
- Agrawal AD. Pharmacological activities of flavonoids: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2011; 4(2): 1394-1398.
- Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H. Potentially cancer chemopreventive and anti-inflammatory terpenoids from natural sources. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2003; 29: 73-126.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001; 357(3): 593-615.
- Aleve[®] (Naproxen sodium) & Naprosyn[®] (Naproxen) Anaprox[®] (Naproxen sodium). Briefing Document for US Food and Drug Administration Advisory Committee Meeting. Bayer Healthcare and Hoffmann-La Roche, 10 Enero 2014, 63 páginas. Disponible en internet: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/>

CommitteesMeetingMaterials/Drugs/ArthritisAdvisoryCommittee/UCM383181.pdf.
Consultado el 7 de marzo de 2016.

Alghasham AA. Cucurbitacins – A promising target for cancer therapy. *International Journal of Health Sciences*. 2013; 7(1):77-89.

Allegra M, D'Acquisto F, Tesoriere L, Attanzio A, Livrea MA. Pro-oxidant activity of indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* modulates arachidonate metabolism and prostaglandin synthesis through lipid peroxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Redox Biology*. 2014; 2: 892-900.

Androutsopoulos VP, Li N, Arroo RR. The methoxylated flavones eupatorin and cirsiol induce CYP1 enzyme expression in MCF7 cells. *Journal of Natural Products*. 2009; 72(8): 1390-1394.

Aravindaram K, Yang NS. Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. *Planta Medica*. 2010; 76(11): 1103-1117.

Aribi A, Gery S, Lee DH, Thoennissen NH, Thoennissen GB, Alvarez R, Ho Q, Lee K, Doan NB, Chan KT, Toh M, Said JW, Koeffler P. The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2013; 132(12): 2730-2737.

Arrebola DFA, Fernández LAR, Sánchez DLC. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea, retel*. 2003. Disponible en internet https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Arencibia/publication/242644724_Principales_ensayos_para_determinar_la_citotoxicidad_de_una_sustancia_algunas_consideraciones_y_su_utilidad/links/0deec5385f44296f6b000000.pdf. Consultado el 16 de octubre de 2015.

Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2012; 43: 385-406.

Ashour M, Wink M, Gershenzon J. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual Plant Reviews*. 2010; 40: 258–303.

- Bader GN, Mir PA, Bhat ZA. Present status of antiinflammatory and anti rheumatic phytoconstituents: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 3(11): 272-310.
- Balabanova S, Parsche S, Pirsig W. First identification of drugs in Egyptian mummies. *Naturwissenschaften*. 1992; 79(8): 358-358.
- Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 10(1): 3-6.
- Balzar S, Fajt ML, Comhair SAA, Erzurum SC, Bleecker E, Busse WW, Castro M, Gaston B, Israel E, Schwartz LB, Curran-Everett D, Moore CG, Wenzel SE. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011; 183: 299–309.
- Barkovich R, Liao JC. Review: metabolic engineering of isoprenoids. *Metabolic Engineering*. 2001; 3: 27-39.
- Barnes PJ, Adcock I, Spedding M, Vanhoutte PM. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1993; 14(12): 436-441.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*. 2004; 63(4): 582-592.
- Bauer R, Wagner H. Cucurbitacinhaltige Drogen. *Deutsche Apotheker-Zeitung*. 1983; 123: 1313-1321.
- Bauer R, Berganza LH, Seligmann O, Wagner H. Cucurbitacins and flavone C-glycosides from *Cayaponia tayuya*. *Phytochemistry*. 1985; 24: 1587–1591.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*. 2003; 133(10): 3248S-3254S.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013; 21(1): 16-21.
- Bernard C. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale par m. Claude Bernard*. 1865; Baillière. Disponible en internet: <https://books.google.com.ar/books?hl=>

es&lr=&id=iBdSKwntgUAC&oi=fnd&pg=PA5&dq=Introduction+%C3%A0+l%27
 %C3%A9tude+de+la+m%C3%A9decine+exp%C3%A9rimentale+par+m.+Claude+
 Bernard&ots=xVc84OMYCJ&sig=SqEolfxhufIU Nnu5rUIfKmkeL64#v=onepage&q
 =Introduction%20%C3%A0%20l%27%C3%A9tude%20de%20la%20m%C3%A9decine
 %20exp%C3%A9rimentale%20par%20m.%20Claude%20Bernard&f=false.

Consultado el 12 de junio de 2016.

- Bernard SA, Olayinka OA. Search for a novel antioxidant, anti-inflammatory/analgesic or anti-proliferative drug: Cucurbitacins hold the ace. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010; 4(25): 2821-2826.
- Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013; 65(15): 2087-2097.
- Boban A, Lambert C, Hermans C. Is the cardiovascular toxicity of NSAIDS and COX-2 selective inhibitors underestimated in patients with haemophilia? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016; 100: 25-31.
- Borins M. Traditional medicine in India. *Canadian Family Physician*. 1987; 33: 1061-1065.
- Botting R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis research*. 2003; 110(5): 269-272.
- Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2005; 72(2): 85-87.
- Boudiaf K, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Marie JC, Derradji Y, Benboubetra M, El-Benna J, Dang PMC. Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*. 2016; 104: 62-73.
- Boumendjel A, Sotoing Taiwe G, Ngo Bum E, Chabrol T, Beney C, Sinniger V, Haudecoeur R, Marcourt L, Challal S, Ferreira Queiroz E, Souard F, Le Borgne M, Lomberget T, Depaulis A, Lavaud C, Robins R, Wolfender JL, Bonaz B, De Waard M. Occurrence of the synthetic analgesic tramadol in an African medicinal plant. *Angewandte Chemie. International Edition*. 2013; 52(45): 11780-11784.

- Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33(9): 1186-1193.
- Bramley PM. Isoprenoid metabolism. En: Dey PM, Harborne JB (Eds.). *Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press. 1997, pp. 418-425.
- Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- κ B pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2002; 54(4): 453-472.
- Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995; 206: 533-540.
- Brunton LL, Knollman B, Chabner BA. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2011.
- Bueno MR. Historia de las hierbas mágicas y medicinales. *Madrid-España. Nutilus*; 2008; 32-36.
- Butenko IG, Gladchenko SV, Galushko SV. Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C4 biosynthesis *in vitro* by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* georgy roots. *Agents Actions*. 1993; 39(1): 49-51.
- Calixto JB, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Medica*. 2003; 69(11): 973-983.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. 2004; 70(02): 93-103.
- Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutrition Research and Practice*. 2010; 4(4): 259-269.
- Cao TW, Geng CA, Jiang FQ, Ma YB, He K, Zhou NJ, Zhang XM, Zhou J, Chen JJ. Chemical constituents of *Swertia yunnanensis* and their anti-hepatitis B virus activity. *Fitoterapia*. 2013; 89: 175-182.

- Carlsson E, Ding JL, Byrne B. SARM modulates MyD88-mediated TLR activation through BB-loop dependent TIR-TIR interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016; 1863(2): 244-253.
- Carty M, Reinert L, Paludan SR, Bowie AG. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends in Immunology*. 2014; 35(2): 79-87.
- Casado JG, Legorburu EM, Casero MDCV (1984). Desarrollo de la Farmacognosia en el descubrimiento y aislamiento de los principios activos de la adormidera. En: *Actas II Congreso de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias*: Jaca, 27 de Septiembre-1 de Octubre, 1982 (pp. 189-196). Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas, SEHCYT.
- Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Brent Carterg A, Rothmanh PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(26): 9035-9040.
- Castro FO, Portelles Y. Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biotechnología Aplicada*. 1997; 14: 149-161.
- Chan MMY, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *The Journal of Immunology*. 2010; 184(11): 6418-6426.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410: 37-40.
- Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Current Pharmaceutical Design*. 2003; 9(27): 2177-2190.
- Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2005; 11(26): 3431-3447.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30(7): 1073-1081.

- Cosan DT, Soyocak A. Inhibiting telomerase activity and inducing apoptosis in cancer cells by several natural food compounds. *Reviews on Selected Topics of Telomere Biology* (INTECH Open Access Publisher). 2012; 123-148. Disponible en internet: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40895.pdf>. Consultado el 18 de mayo de 2016.
- Courts FL, Williamson G. The occurrence, fate and biological activities of C-glycosyl flavonoids in the human diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013; 55(10): 1352-1367.
- Cultek. Transfección. Nota técnica. 2006. Disponible en internet: http://www.cultek.com/inf/otros/Notas_tecnicas/transfeccion.pdf. Consultada el 31 de octubre de 2012.
- Chao JI, Su WC, Liu HF. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007; 6(11): 3039-3048.
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 2010; 10(12): 826-837.
- Chen TY, Sun HL, Yao HT, Lii CK, Chen HW, Chen PY, Li CC, Liu KL. Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55: 257-264.
- Chen CL, Zhang DD. Anti-inflammatory effects of 81 Chinese herb extracts and their correlation with the characteristics of Traditional Chinese Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 2014: 985176.
- Chen X, Miao J, Wang H, Zhao F, Hu J, Gao P, Wang Y, Zhang L, Yan M. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 170: 72-80.
- Cheng JT. Review: drug therapy in Chinese traditional medicine. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2000; 40(5): 445-450.

- Cheng SY, Xu F, Wang Y. Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009; 3(13): 1248-1252.
- Chiu JH, Lay S, Su MY, Chiu HL, Chiu AC, Lui WY, Wu CW. Tumor necrosis factor-producing activity of wogonin in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Planta Medica*. 2002; 68(11): 1036-1039.
- Choi JS, Islam MN, Ali MY, Kim EJ, Kim YM, Jung HA. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 64: 27-33.
- Choi SY, Choi JY, Lee JM, Lee S, Cho EJ. Tartary buckwheat on nitric oxide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Food and Function*. 2015; 6(8): 2664-2670.
- Dalen, JE. Selective COX-2 inhibitors, NSAIDs, aspirin and myocardial infarction. *Archives of Internal Medicine*. 2002; 162(10): 1091-1092.
- Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation and Allergy Drug Targets*. 2007; 6(3): 168-73.
- Datar P, Srivastava S, Coutinho E, Govil G. Substance P: structure, function, and therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004; 4(1): 75-103.
- De Candolle A, De Candolle C. *Monographiae Phanerogamarum*. 1881; 3: 772-774. Disponible en internet <http://www.botanicus.org/page/1697103>. Consultado el 6 de abril de 2016.
- de Jager J, Dekker JM, Kooy A, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation explain much of the excess cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes. The Hoorn Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006; 26(5): 1086-1093.
- de la Fuente González A, Lozano JR, Capdevila EF. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel*. 2007; 22(5): 252-258.
- de las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation and Allergy Drug Targets*. 2009; 8(1): 28-39.

- De León EJ, Alcaraz MJ, Domínguez JN, Charris J, Terencio MC. 1-(2, 3, 4-trimethoxyphenyl)-3-(3(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivative with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Inflammation Research*. 2003; 52(6): 246-257.
- de Micheli-Serra A. Acerca de la terapéutica digitálica. Bosquejo histórico. *Gaceta Médica de México*. 2000; 136(5): 511-518.
- De Pasquale A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 11(1): 1-16.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*. 1989; 26(3-4): 335-341.
- DeBruin EJ, Gold M, Lo BC, Snyder K, Cait A, Lasic N, Lopez M, McNagny KM, Hughes MR. Mast cells in human health and disease. *Methods in Molecular Biology*. 2015; 1220: 93-119.
- D'Elia RV, Harrison K, Oyston PC, Lukaszewski RA, Clark GC. Targeting the “cytokine storm” for therapeutic benefit. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013; 20(3): 319-327.
- Dev S. Terpenoids. En: Rowe JW (Ed.). *Natural Products of Woody Plants*. Berlin: Springer-Verlag. 1989, pp. 691-807.
- Dos Santos RI, Dos Santos MA, Schenkel EP. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. *International Journal of Pharmacognosy*. 1996; 34(4): 300-302.
- dos Santos MD, Chen G, Almeida MC, Soares DM, de Souza GEP, Lopes NP, Lantz RC. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophora ericoides* on *in vitro* inflammatory mediator production. *Natural Product Communications*. 2010; 5(5): 733-740.
- DuBois RN. Leukotriene A4 signaling, inflammation and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95(14): 1028-1029.

- Dwivedi G, Dwivedi S. Sushruta – the clinician – teacher par excellence. *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences*. 2007; 49(4): 243-244.
- El-Toumy SA, Omara EA, Nada SA, Bermejo J. Flavone C-glycosides from *Montanoa bipinnatifida* stems and evaluation of hepatoprotective activity of extract. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(8): 1291-1296.
- Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 532(1-2): 145-154.
- Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in Lewis rats by suppression of tumor necrosis factor- α in T lymphocytes and macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007a; 320(2): 581-590.
- Escandell JM, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benso R, Ríos JL. Dihydrocucurbitacin B inhibits delayed type hypersensitivity reactions by suppressing lymphocyte proliferation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007b; 322(3): 1261-1268.
- Escandell JM, Recio MC, Giner R M, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Merfort I, Ríos JL. Inhibition of delayed-type hypersensitivity by cucurbitacin R through the curbing of lymphocyte proliferation and cytokine expression by means of nuclear factor AT translocation to the nucleus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010; 332(2): 352-363.
- Evans WC (Ed.). *Trease and Evans' Pharmacognosy*. 16^a ed. Edimburgo: Saunders Elsevier. 2009.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101(4): 890-898.

- Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*. 2004; 10(2):71-84.
- Fang Q, Wang J, Wang L, Zhang Y, Yin H, Li Y, Tong C, Liang G, Zheng C. Attenuation of inflammatory response by a novel chalcone protects kidney and heart from hyperglycemia-induced injuries in type 1 diabetic mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015; 288(2): 179-191.
- Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Research Reviews*. 2015; 24(Pt A): 29-39.
- Ferreira da Costa GF. *Cymbopogon citratus* and its polyphenols as potential phytotherapeutic products: an in vivo approach (tesis doctoral). Portugal: University of Coimbra; 2015. Disponible en internet <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/bitstream/10316/29994/1/Cymbopogon%20citratus%20and%20its%20polyphenols%20as%20potential%20phytotherapeutic%20products.pdf>. Consultado 5 de febrero de 2016.
- Filippi MD. Leukocyte transcellular diapedesis: Rap1b is in control. *Tissue Barriers*. 2015; 3(3): e1052185.
- Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. 2014; 69 (Suppl 1): S4-S9.
- Freitas ASHDJ, da Silva AB, Hidalgo ADRB, de Sousa JRE, Macedo LF, Pasa MC. Estudo etnobotânico de cipós comercializados como medicinais por raizeiros de Cuiaba, Mato Grosso, Brasil. *FLOVET - Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica*. 2013; 1(5).
- Fujita E. The chemistry on diterpenoids in 1971. *Bulletin of the Institute for Chemical Research*. 1974; 52(3): 519-560.
- Fujita T, Takeda Y, Shingu T. Longikaurin A and B; new, biologically active diterpenoids from *Rabdosia longituba*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1980; 5: 205-207.

- Fujita T, Takeda Y, Sun HD, Minami Y, Marunaka T, Takeda S, Yamada Y, Togo T. Cytotoxic and antitumor activities of *Rabdosia* diterpenoids. *Planta Medica*. 1988; 54(5): 414-417.
- Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *The Journal of Pathology*. 2013; 231(1): 8-20.
- Fuster V, Sweeny JM. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation*. 2011; 123(7): 768-778.
- Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008; 47(2): 729-736.
- Gazola AC. Estudo químico das raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata* Cogn., (disertación de maestría). Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008. Disponible en internet <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/91798>. Consultado el 7 de abril de 2016.
- Giang PM, Jin HZ, Son PT, Lee JH, Hong YS, Lee JJ. *ent*-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF- κ B activation and NO production. *Journal of Natural Products*. 2003; 66(9): 1217-1220.
- Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*. 1990; 62(13): 1202-1214.
- Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2004; 3(5): 401-416.
- Gislason GH, Jacobsen S, Rasmussen JN, Rasmussen S, Buch P, Friberg J, Schramm TK, Abildstrom SZ, Køber L, Madsen M, Torp-Pedersen C. Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006; 113(25): 2906-2913.
- Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *La Clinica Terapéutica*. 2001; 152(4): 249-253.

- Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004; 305(5691): 1733-1736.
- Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- β (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *Journal of Immunology*. 2004; 173(5): 2913-2917.
- Goldbach-Mansky R. Blocking interleukin-1 in rheumatic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009; 1182: 111-123.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL, Mira L, Corvo ML. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(16): 1586-1605.
- Gomes-Costa GA, Alves M. Flora of the Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Cucurbitaceae. *Rodriguésia*. 2012; 63(4): 817-829.
- Gonzalez FG, Di Stasi LC. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine*. 2002; 9(2): 125-134.
- González M, Vega A. ¿Cómo superar la membrana celular? *Revista de Salud Animal*. 2007; 29(1): 8-20.
- González R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, Medina FSD. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011; 51(4): 331-362.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews. Immunology*. 2003; 3(1): 23-35.
- Goto M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Bioscience Trends*. 2008; 2(6): 218-230.
- Grau de Castro JJ. Inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en la prevención del cáncer. *Revista Clínica Española*. 2005; 205(9): 446-456.

- Gray CM. Mechanisms of non-canonical NF- κ B regulation. 2014. Disponible en internet <http://repository.upenn.edu/edissertations/1293/>. Consultado el 3 de mayo de 2016.
- Greenlee-Wacker M. Inflammation and host response to infection. *Molecular Life Sciences*. 2014; 1-10.
- Grimm EA, Sikora AG, Ekmekcioglu S. Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. *Clinical Cancer Research*. 2013; 19(20): 5557-5563.
- Gu R, Wang Y, Long B, Kennelly E, Wu S, Liu B, Li P, Long C. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014; 37(6): 903-915.
- Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, Cimerman A. Pleurotus fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. *FEMS Microbiology Letters*. 1993; 113(3): 333-337.
- Haas H. History of antipyretic analgesic therapy. *The American Journal of Medicine*. 1983; 75(5A): 1-3.
- Hall RV, Murillo PN, Rocha PM, Rodríguez VE. Antiinflamatorios no esteroidales (AINES). Centro Nacional de Información de Medicamentos. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. Julio de 2001, 88 páginas. Disponible en internet <http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed18.pdf>. Consultado 16 de marzo de 2016.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55(6): 481-504.
- Harvey AL. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007; 11(5): 480-484.
- Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2008; 13(19-20): 894-901.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 96(2-3): 67-202.

- He F, Xiao WL, Pu JX, Wu YL, Zhang HB, Li XN, Zhao Y, Yang LB, Chen GQ, Sun HD. Cytotoxic *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*. *Phytochemistry*. 2009; 70(11-12): 1462-1466.
- Henderson RB, Hobbs JA, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*. 2003; 102(1): 328-335.
- Henderson C, Goldbach-Mansky R. Monogenic autoinflammatory diseases: new insights into clinical aspects and pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2010; 22(5): 567-578.
- Himeno E, Nagao T, Honda J, Okabe H, Irino N, Nakasumi T. Structures of cayaponosides A, B, C and D, glucosides of new *nor*-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1992; 40(10): 2885-2887.
- Himeno E, Nagao T, Honda J, Okabe H, Irino N, Nakasumi T. Structures of new non-aromatized *nor*-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia tayuya*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1993; 41(5): 986-988.
- Himeno E, Nagao T, Honda J, Okabe H, Irino N, Nakasumi T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. I. Structures of cayaponosides, new 29-nor-1,2,3,4,5,10-hexadehydrocucurbitacin glucosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1994a; 42(11): 2295-2300.
- Himeno E, Nagao T, Honda J, Okabe H, Irino N, Nakasumi T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. II. Structures of cayaponosides, new 29-nor-2,11-dioxocucurbita-3,5-diene glucosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1994b; 42(11): 2301-2304.
- Himeno E, Nagao T, Honda J, Okabe H, Irino N, Nakasumi T. Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vel.) Cogn. III. Structures of cayaponosides, 29-nor-1,2,3,4,5,10-hexadehydrocucurbit-6-ene glucosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1994c; 42(11): 2370-2372.
- Hong SS, Lee SA, Han XH, Hwang JS, Lee C, Lee D, Hong JT, Kim Y, Lee H, Hwang BY. *ent*-Kaurane diterpenoids from *Isodon japonicus*. *Journal of Natural Products*. 2008; 71(6): 1055-1058.

- Hong JM, Kwon OK, Shin IS, Jeon CM, Shin NR, Lee J, Park SH, Bach TT, Hai DV, Oh SR, Han SB, Ahn KS. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Canarium lyi* C.D. Dai & Yakovlev in RAW 264.7 macrophages and a murine model of lipopolysaccharide-induced lung injury. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015; 35(5): 1403-1410.
- Hou AJ, Li ML, Jiang B, Lin ZW, Ji SY, Zhou YP, Sun HD. New 7,20:14,20-diepoxy *ent*-kauranoids from *Isodon xerophilus*. *Journal of Natural Products*. 2000a; 63(5): 599-601.
- Hou AJ, Yang H, Jiang B, Zhao QS, Liu YZ, Lin ZW, Sun HD. Two new *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. *Chinese Chemical Letters*. 2000b; 11(9): 795-798.
- Hou AJ, Yang H, Liu YZ, Zhao QS, Lin ZW, Sun HD. Novel *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. *Chinese Journal of Chemistry*. 2001a; 19(4): 365-370.
- Hou AJ, Zhao QS, Li ML, Jiang B, Lin ZW, Sun HD, Zhou YP, Lu Y, Zheng QT. Cytotoxic 7,20-epoxy *ent*-kauranoids from *Isodon xerophilus*. *Phytochemistry*. 2001b; 58(1): 179-183.
- Huang ST, Chen CT, Chieng KT, Huang SH, Chiang BH, Wang LF, Kou HS, Lin CM. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor α , prostaglandin E₂, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1042: 387-395.
- Huang SX, Pu JX, Xiao WL, Li LM, Weng ZY, Zhou Y, Han QB, Peng SL, Ding LS, Lou LG, Sun HD. *ent*-Abietane diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *rubescens*. *Phytochemistry*. 2007; 68(5): 616-622.
- Huguet AI, Máñez S, Alcaraz MJ. Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1990; 45(1-2), 19-24.
- Huscher D, Thiele K, Gromnica-Ihle E, Hein G, Demary W, Dreher R, Zink A, Buttgerit F. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009; 68(7): 1119-1124.

- Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010; 327(5963): 291-295.
- Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, Galvano F, Bei R. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2012; 17: 2396-2418.
- Jalkanen S, Karikoski M, Mercier N, Koskinen K, Henttinen T, Elima K, Salmivirta K, Salmi M. The oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) induces endothelial E- and P-selectins and leukocyte binding. *Blood*. 2007; 110(6): 1864-1870.
- Javois LC. (Ed.). *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Totowa (New Jersey): Humana Press. 1999, pp. 3-8.
- Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*. 2003; 189(1): 11-16.
- Ji H, Shengji P, Chunlin L. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the Lisu people in Nujiang, northwest Yunnan, China. *Economic Botany*. 2004; 58(1): S253-S264.
- Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 2015; 69: 496-502.
- Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2006; 125(5): 943-955.
- Khan M, Fraser A. Cox-2 inhibitors and the risk of cardiovascular thrombotic events. *Irish Medical Journal*. 2012; 105(4): 119-121.
- Kaplanski G, Farnarier C, Benoliel AM, Foa C, Kaplanski S, Bongrand P. A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *Journal of Cell Science*. 1994; 107(Pt 9): 2449-2457.
- Karenberg A, Leitz C. Headache in magical and medical papyri of ancient Egypt. *Cephalalgia*. 2001; 21(9): 911-916.

- Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2016; 43(2-3): 155-176.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010; 11(5): 373-384.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004; 96(3): 229-245.
- Kim MK, Yun KJ, Lim DH, Kim J, Jang YP. Anti-inflammatory properties of flavone di-C-glycosides as active principles of *Camellia mistletoe*, *Korthalsella japonica*. *Biomolecules and Therapeutics*. 2016; en prensa. doi: 10.4062/biomolther.2016.019.
- Kirkby NS, Chan MV, Zaiss AK, Garcia-Vaz E, Jiao J, Berglund LM, Verduc EF, Ahmetaj-Shalaa B, Wallacec JL, Herschmand HR, Gomez MF, Mitchell JA. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113(2): 434-439.
- Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 1985; 228(4703), 1049-1055.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*. 1994; 298(Pt 2): 249-258.
- Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 88(6): 1157-1162.
- Koeberle A, Werz O. Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Discovery Today*. 2014; 19(12): 1871-1882.
- Konoshima T, Takasaki M, Kozuka M, Nagao T, Okabe H, Irino N, Nakasumi T, Tokuda H, Nishino H. Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor.II. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1995; 18(2): 284-287.

- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10(6): 659-667.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013: 162750.
- Kwon DJ, Ju SM, Youn GS, Choi SY, Park J. Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF- κ B and AP-1 activation in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 58:479-486.
- Küpeli E, Aslan M, Gürbüz I, Yesilada E. Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2004; 59(11-12): 787-790.
- Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2009; 14: 4436-4443.
- Lai CY, Pan SL, Chen CC, Teng CM. Aciculatin, a C-glycosidic flavonoid, induces p53-dependent cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. *The FASEB Journal*. 2011; 25(1 Supplement): 621-627.
- Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*. 2007; 15(6): 279-289.
- Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VGM, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation and Allergy Drug Targets*. 2013; 12(5): 349-361.
- Lavie D, Willner D. The Constituents of *Ecballium elaterium* L. III. Elatericin A and B. *Journal of the American Chemical Society*. 1958; 80(3): 710-714.
- Lee Y, Rodriguez C, Dionne RA. The role of COX-2 in acute pain and the use of selective COX-2 inhibitors for acute pain relief. *Current Pharmaceutical Design*. 2005; 11(14): 1737-1755.
- Lee JH, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Archives of Pharmacal Research*. 2007a; 30(10): 1318-1327.

- Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF- κ B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Molecules and Cells*. 2007b; 23(3): 398-404.
- Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of Food Science*. 2010; 75(7): H212-H217.
- Leung CH, Grill SP, Lam W, Han QB, Sun HD, Cheng YC. Novel mechanism of inhibition of nuclear factor- κ B DNA-binding activity by diterpenoids isolated from *Isodon rubescens*. *Molecular Pharmacology*. 2005; 68(2): 286-297.
- Leung CH, Grill SP, Lam W, Gao W, Sun HD, Cheng YC. Eriocalyxin B inhibits nuclear factor- κ B activation by interfering with the binding of both p65 and p50 to the response element in a noncompetitive manner. *Molecular Pharmacology*. 2006; 70(6): 1946-1955.
- Li HW, Hedge IC. Lamiaceae. *Flora of China*. 1994; 17: 50-299. Disponible en internet <http://flora.huh.harvard.edu/China/mss/volume17/Lamiaceae.published.pdf>. Consultado 23 de abril de 2016.
- Li SH, Niu XM, Peng LY, Zhang HJ, Yao P, Sun HD. *ent*-Kaurane diterpenoids from the leaves of *Isodon xerophilus*. *Planta Medica*. 2002; 68(10): 946-948.
- Li LM, Weng ZY, Huang SX, Pu JX, Li SH, Huang H, Yang BB, Han Y, Xiao WL, Li ML, Han QB, Sun HD. Cytotoxic *ent*-kauranoids from the medicinal plant *Isodon xerophilus*. *Journal of Natural Products*. 2007, 70(8): 1295-1301.
- Li LM, Pu JX, Xiao WL, Sun HD. *ent*-Abietane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. *Archives of Pharmacal Research*. 2011; 34(6): 875-879
- Li LM, Pu JX, Xiao WL, Sun HD. Triterpenes from *Isodon xerophilus*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2012; 10(4): 307-310.
- Lim JY, Won TJ, Hwang BY, Kim HR, Hwang KW, Sul D, Park SY. The new diterpene isodojaponin D inhibited LPS-induced microglial activation through NF- κ B and

- MAPK signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 642(1-3): 10-18.
- Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W. Suppression of inflammatory responses by black rice extract in RAW 264.7 macrophage cells via downregulation of NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*. 2015; 16(10): 4277-4283.
- Lin CM, Huang ST, Liang YC, Lin MS, Shih CM, Chang YC, Chen TY, Chen CT. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. *Planta Medica*. 2005; 71(8): 748-753.
- Lin Z, Guo Y, Gao Y, Wang S, Wang X, Xie Z, Niu H, Chang W, Liu L, Yuan H, Lou H. *ent*-Kaurane diterpenoids from Chinese liverworts and their antitumor activities through Michael addition as detected *in situ* by a fluorescence probe. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58(9): 3944-3956.
- Linares Casas JC. La digital: su historia y su rol actual. *Revista Médica de Rosario*. 2015; 81: 32-39.
- Liu J, Sudom A, Min X, Cao Z, Gao X, Ayres M, Lee F, Cao P, Johnstone S, Plotnikova O, Walker N, Chen G, Wang Z. Structure of the nuclear factor κ B-inducing kinase (NIK) kinase domain reveals a constitutively active conformation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(33): 27326-27334.
- Liu X, Wu WY, Jiang BH, Yang M, Guo DA. Pharmacological tools for the development of traditional Chinese medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013; 34(11): 620-628.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. México: Editorial Médica Panamericana. 2005, pp. 377-380.
- Lomonte B. *Manual de Métodos Inmunológicos*, 4^o ed., San José: Universidad de Costa Rica; 2007, pp. 92-100. Disponible en internet <http://kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/>

10669/9244/2007_Manual_Metodos_Inmunologicos_completo_web.pdf?sequence=1
Consultado el 13 de julio de 2016

- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42(2): 145-151.
- Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*. 2013; 139(1-4): 503-508.
- Machado L. Control de calidad de productos fitoterapéuticos. En: Pinzón SR (Ed.) Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fé de Bogotá: CYTED. 2000, pp. 157-176.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997; 15: 323-350.
- Madonna G, Ullman CD, Gentilcore G, Palmieri G, Ascierto PA. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10: 53.
- Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2013; 77(3): 482-486.
- Maitra U, Deng H, Glaros T, Baker B, Capelluto DG, Li Z, Li L. Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*. 2012; 189(2): 1014-1023.
- Majno G. The healing hand: man and wound in the ancient world. Londres: Harvard University Press; 1991.
- Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*. 1997; 46(1): 4-18.
- Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. 2000; 7(6 Pt 2): S29-S34.

- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004; 25(12): 677-686.
- Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. 2ª ed. Caracas: Editorial Torino. 2002.
- Marovac J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista Médica de Chile*. 2001; 129(1): 99-106.
- Marrassini C, Davicino R, Acevedo C, Anesini C, Gorzalczany S, Ferraro G. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis*. *Journal of Natural Products*. 2011; 74(6): 1503-1507.
- Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*. 2004; 4(10): 787-799.
- Martínez Cordero H, Montenegro González P, Restrepo JF, Rondón Herrera F, Quintana G, Iglesias Gamarra A. Historia de los glucocorticoides. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2010; 17(3): 147-171.
- Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks. *Current Pharmaceutical Design*. 2007; 13(22): 2215-2227.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6:13.
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27: 229-265.
- Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *Journal of Nippon Medical School*. 2012; 79(1): 4-18.
- Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*. 2009; 120(20): 2012-2024.
- McClatchey W, Stevens J. An overview of recent developments in bioprospecting and pharmaceutical development. En: Saxena PK (Ed.). *Development of Plant-Based*

- Medicines: Conservation, Efficacy and Safety. Dordrecht (Alemania): Kluwer Academic Publishers. 2001, pp. 17-45.
- McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*. 1995; 7(7): 1015-1026.
- McMahon B, Mitchell S, Brady HR, Godson C. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001; 22(8): 391-395.
- McNeill E, Crabtree MJ, Sahgal N, Patel J, Chuaiphichai S, Iqbal AJ, Hale AB, Greaves DR, Channon KM. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015; 79: 206-216.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): 428-435.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140(6): 771-776.
- Meirer K, Steinhilber D, Proschak E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014; 114(1): 83-91.
- Metcalf RL, Metcalf RA, Rhodes AM. Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980; 77(7): 3769-3772.
- Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1998; 439: 175-182.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides Tc. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52(4):673–751.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews. Microbiology*. 2005; 3(1): 36-46.
- Miller LH, Su X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell*. 2011; 146(6): 855-858.

- Miller PE, Martin SS. Approach to statin use in 2016: an update. *Current Atherosclerosis Reports*. 2016; 18: 20.
- Minnicozzi M, Sawyer RT, Fenton MJ. Innate immunity in allergic disease. *Immunological Reviews*. 2011; 242(1): 106-127.
- Miró M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy Research*. 1995; 9(3): 159-168.
- Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 46(10): 4769-4807.
- Molholt B, Doskočil J. Increased transformation frequency in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1978; 82(2): 477-483.
- Molloy PL. Electrophoretic mobility shift assays. En: Tymms M.J. (Ed.) *Methods in Molecular Biology. Transcription Factor Protocols*. Totowa (New Jersey): Humana Press Inc. 2000. pp 235-246.
- Montanha JA, Schenkel EP, Cardoso-Taketa AT, Dresch AP, Langeloh A, Dallegrove E. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009; 19(1A): 29-32.
- Moore RN, Bigam G, Chan JK, Hogg AM, Nakashima TT, Vederas JC. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevinolin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen atoms by carbon-13 NMR and mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*. 1985; 107(12): 3694-3701.
- Morteau O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2000; 48(6): 473-480.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
- Mostaza Prieto JM. Sobre el descubrimiento de los fármacos hipolipemiantes. *Medicina Clínica*. 2008; 130(18): 698-703.

- Mouradov A, Spangenberg G. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5: 620.
- Mukherjee PK. Evaluation of Indian traditional medicine. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*. 2001; 35(2): 623-632.
- Mukherjee PK, Wahile A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 103(1): 25-35.
- Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circulation Research*. 2009; 105(3): 223-230.
- Müller-Esterl W. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Barcelona: Editorial Reverté. 2008, pp. 296-297.
- Mundhekar AN, Bullard DC, Kucik DF. Intracellular heterogeneity in adhesiveness of endothelium affects early steps in leukocyte adhesion. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2006; 291(1): C130-C137.
- Municio AM. Medicamentos viejos para enfermedades nuevas. Disponible en internet <http://www.rac.es/ficheros/doc/00345.pdf>. Consultado el 15 de febrero de 2015.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*. 1984; 5(1): 25-44.
- Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *International Journal of Cancer*. 2007; 121(11): 2357-2363.
- Nam NH. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2006; 6(8): 945-951.
- Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(19): 13725-13728.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420(6917): 846-852.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews. Immunology*. 2006; 6(3): 173-182.

- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nature Immunology*. 2014; 15(7): 602-611.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012; 75(3): 311-335.
- Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation. *Journal of Immunology*. 2007; 179(10): 7121-7127.
- Nicolaou A. Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2013; 88(1): 131-138.
- Niculescu F, Rus H. Complement activation and atherosclerosis. *Molecular Immunology*. 1999; 36(13-14): 949-955.
- Nieto-Ramirez IJ, Chegwin-Angarita C, Atehortúa L, Sepúlveda LJ. Las estatinas: química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. *Vitae*. 2013; 20(1): 49-63.
- Niu XM, Li SH, Na Z, Lin ZW, Sun HD. Two novel ent-abietane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. *Helvetica Chimica Acta*. 2004; 87(8): 1951-1957.
- Normile D. Nobel for antimalarial drug highlights East-West divide. *Science*. 2015; 350(6258): 265.
- Okin D, Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*. 2012; 22(17): R733-R740.
- Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2002; 53(4 Pt 1): 571-584.
- Omenetti A, Chiesa S, Gattorno M. Principles of inflammation for the pediatrician. *Pediatric Clinics of North America*. 2012; 59(2): 225-243.
- Orlikova B, Legrand N, Panning J, Dicato M, Diederich M. Anti-inflammatory and anticancer drugs from nature. *Cancer Treatment and Research*. 2014; 159: 123-143.

- Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Okuda K. An investigation of diterpenes from the leaves of *Rabdosia trichocarpa* and their antibacterial activity against oral microorganisms. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1994; 42(4): 922-925.
- O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance NO and MMP-9 interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1843(3): 603–617.
- Pal S, Bhattacharjee A, Ali A, Mandal NC, Mandal SC, Pal M. Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. *Journal of Inflammation*. 2014; 11: 23.
- Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*. 2010; 1: 15-31.
- Pattanaik B, Lindberg P. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. *Life*. 2015; 5(1): 269-293.
- Patel MB, Mishra SH. Hypoglycemic activity of C-glycosyl flavonoid from *Enicostemma hyssopifolium*. *Pharmaceutical Biology*. 2011; 49(4): 383-391.
- Patel D, Kaur G, Sawant MG, Deshmukh P. Herbal medicine - A natural cure to arthritis. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2013; 4(1): 27-35.
- Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Current Opinion in Immunology*. 2014; 29: 23-28.
- Payá M, Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JL, Alcaraz MJ. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*. 1993; 7(2): 159-162.
- Peluso I, Raguzzini A, Serafini M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- α and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2013; 57(5): 784-801.
- Pelletier SW, Chokshi HP, Desai HK. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *Journal of Natural Products*. 1986; 49(5): 892-900.

- Peña RAE. Contribución al estudio de los ácidos kaurenicos aislados de *Coespeletia moritziana* (trabajo de grado de licenciatura en química). Mérida (Venezuela): Universidad de los Andes. 2008, p. 6.
- Pinagé GR. *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. En: Mary Navaes da Silva Rios, Floriano Pastore Jr (Organizadores). *Plantas da Amazônia: 450 especies de uso geral*; 2011, pp. 974-983. Disponible en internet <http://leunb.bce.unb.br/handle/123456789/19>. Consultado el 3 de abril de 2016.
- Plotkin MJ, Balick MJ. Medicinal uses of South American palms. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 10(2): 157-179.
- Poon BY, Raharjo E, Patel KD, Tavener S, Kubes P. Complexity of inducible nitric oxide synthase cellular source determines benefit versus toxicity. *Circulation*. 2003; 108(9): 1107-1112.
- Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Medica*. 2010; 76(11): 1044-1063.
- Predonzani A, Calì B, Agnellini AHR, Molon B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: when inflammation says nitric oxide. *World Journal of Experimental Medicine*. 2015; 5(2): 64-76.
- Prockop DJ. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells*. 2013; 31(10): 2042-2046.
- Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcellular Biochemistry*. 2007; 42: 3-27.
- Raintree. Tropical plant database. The Amazon plants. *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. Carson City (USA). Disponible en internet <http://www.rain-tree.com/tayuya.htm#V6Dma9LhAdU>. Consultado el 2 de agosto de 2016.
- Ramasamy R, Vannucci SJ, Du Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005; 15(7): 16R-28R.

- Ramesh M, Turner LF, Yadav R, Rajan TV, Vella AT, Kuhn LT. Effects of the physico-chemical nature of two biomimetic crystals on the innate immune response. *International Immunopharmacology*. 2007; 7(13): 1617-1629.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang y Dale Farmacología. 7ª ed. Barcelona: Elsevier. 2012.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 1988; 241(4866): 708-712.
- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation and Allergy Drug Targets*. 2009; 8(3): 229-235.
- Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature Reviews. Immunology*. 2007; 7(12): 964-974.
- Ravishankar B, Shukla VJ. Indian systems of medicine: a brief profile. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007; 4(3): 319-337.
- Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Mánuez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Medica*. 2004; 70(5): 414-420.
- Recio MC, Andújar I, Ríos JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 19(14): 2088-2103.
- Rezaeizadeh H, Alizadeh M, Naseri M, Ardakani MS. The Traditional Iranian Medicine point of view on health and disease. *Iranian Journal of Public Health*. 2009; 38(Suppl.1): 169-172.
- Ribeiro D, Freitas M, Lima JL, Fernandes E. Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. *Medicinal Research Reviews*. 2015; 35(5): 877-936.
- Ríos JL, Giner RM, Jiménez MJ, Wickman G, Hancke JL. A study of the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. *Fitoterapia*. 1990; 61(3): 275-278.

- Ríos JL, Escandell JM, Recio MC. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. En: Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*; vol. 32: (Part L). 2005, pp. 429-469.
- Ríos JL, Recio MC, Escandell JM, Andújar I. Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15(11): 1212-1237.
- Ríos JL. Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 128(1): 1-14
- Risitano R, Currò M, Cirimi S, Ferlazzo N, Campiglia P, Caccamo D, Ientile R, Navarra, M. Flavonoid fraction of Bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107431.
- Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology*. 2008; 3: 99-126.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*. 2001; 25(1): 102-123.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2007; 9(2): 17-35.
- Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery*. 2014; 155(6): 961-973.
- Rubió L, Motilva MJ, Romero MP. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013; 53(9): 943-953.
- Ruibal León A, Fernández Machín LM, González García VM. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina*. 2004; 43(4): versión on-line

- disponible en internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232004000400007. Consultado el 20 de junio de 2016.
- Rumzhum NN, Ammit AJ. Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2016; 46(3): 397-410.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65(19): 2979-2999.
- Santiago M, Strobel S. Thin layer chromatography. *Methods in Enzymology*. 2013; 533: 303-324.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 96(1): 23-43.
- Schwab JM, Serhan CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6(4): 414-420.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007; 447(7146): 869-874.
- Scott DJ, Hull MA, Cartwright EJ, Lam WK, Tisbury A, Poulosom R, Markham AF, Bonifer C, Coletta PL. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc^{Min/+} mouse. *Gastroenterology*. 2001; 121(4): 889-899.
- Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2011; 10(7): 369-374.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010; 69(3): 273-278.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews. Immunology*. 2008; 8(5): 349-361.
- Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*. 2015; 27(3): 200-215. Academic Press.

- Shaveta S, Singh A, Kaur J, Singh P. Arachidonic acid metabolic pathway: appraisal of differential availability of arachidonic acid and anti-inflammatory drugs to COX-1, COX-2 and 5-LOX enzymes. *Inflammation and Cell Signaling*. 2014; 1: e176.
- Shen X, Isogai A, Furihata K, Sun HD, Suzuki A. Maoecrystal M: a naturally occurring symmetric *ent*-kaurane dimer from *Rabdosia eriocalyx*. *Phytochemistry*. 1994; 35(3), 725-729.
- Sherma J. Basic TLC techniques, materials, and apparatus. En: Sherma J, Fried B (Eds.) *Handbook of thin-layer chromatography*. 3^a ed. New York: Marcel Dekker. 2003, pp. 1-61.
- Shibata T, Nagata K, Kobayashi Y. Pivotal Advance: A suppressive role of nitric oxide in MIP-2 production by macrophages upon coculturing with apoptotic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006; 80:744-752.
- Shie JJ, Chen CA, Lin CC, Ku AF, Cheng TJR, Fang JM, Wong CH. Regioselective synthesis of di-C-glycosylflavones possessing anti-inflammation activities. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2010; 8(19): 4451-4462.
- Shu YZ. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*. 1998; 61(8): 1053-1071.
- Shultes RE, Raffaaf RF. La selva sanadora: plantas medicinales y tóxicas del noroeste del Amazonas. *Revista de Estudios Sociales*. 2009; 32: 126-143.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69: 145-182.
- Smith DC. Quinine and fever: the development of the effective dosage. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. 1976; 31(3): 343-367.
- Sneider W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *British Medical Journal*. 2000; 321(7276): 1591-1594.
- So A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout. *Arthritis Research and Therapy*. 2008; 10(5): 221.

- Souza PR, Norling LV. Implications for eicosapentaenoic acid- and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutics for arthritis. *European Journal of Pharmacology*. 2016; 785: 165-173.
- Sridhar C, Krishnaraju AV, Subbaraju GV. Antiinflammatory constituents of *Teramnus labialis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 68(1): 111-114.
- Stanley PL, Steiner S, Havens M, Tramposch KM. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology*. 1991; 4: 262-271.
- Stratz C, Anakwue J, Bhatia H, Pitz S, Fiebich BL. Anti-inflammatory effects of 5-HT₃ receptor antagonists in interleukin-1beta stimulated primary human chondrocytes. *International Immunopharmacology*. 2014; 22(1): 160-166.
- Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82(22): 7738-7742.
- Sucher NJ. The application of Chinese medicine to novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2013; 8(1): 21-34.
- Sun HD, Huang SX, Han QB. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Natural Product Reports*. 2006; 23(5): 673-698.
- Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, Liu C, Okunieff P, Zhang L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008; 614: 179-186.
- Sun X, Jiang C, Ma L, Zhao X, Chang J, Zheng B, Li L, Xie W, Li X. 3 β -Angeloyloxy-8 β , 10 β -dihydroxyeremophila-7 (11)-en-12, 8 α -lactone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015; 38(6): 836-843.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-

- regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001; 480-481: 243-268.
- Swain T. Evolution of flavonoid compounds. En: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H (Eds.). *The flavonoids*. New York: Academic Press. 1975, pp. 1096-1129.
- Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107(1): 7-11.
- Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K. Structure–activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E₂ production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*. 2006; 13(5): 310-317.
- Takeda Y, Fujita T, Shingu T. Structure elucidation of longikaurin A and longikaurin B, new biologically active diterpenoids from *Rabdosia longituba* and chemical conversion of oridonin into dihydrolongikaurin A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1988; 1(2): 379-384.
- Talhi O, Silva AMS. Advances in C-glycosylflavonoid research. *Current Organic Chemistry*. 2012; 16(7): 859-896.
- Talhouk RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W, Barbour EK. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10(1): 1-10.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013; 2(2): 70-78.
- Taylor L. Technical data report for tayuya *Cayaponia tayuya*. 2003. Disponible en internet <http://www.rain-tree.com/reports/tayuya-tech.pdf>. Consultado el 3 de abril de 2016.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012; 1822(1): 21-33.

- Tian Q, Li M, Sun HD. Effects of diterpenoids of *Isodon xerophilus* on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line and growth of human hepatocellular carcinoma subcutaneous transplantation tumor in nude mice. *China Pharmacy*. 2006; 15.
- Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2008; 19(10): 371-379.
- Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005; 60(1): 23-29.
- Tohka S, Laukkanen ML, Jalkanen S, Salmi M. Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment *in vivo*. *The FASEB Journal*. 2001; 15(2): 373-382.
- Toro Castaño MF. La respuesta inflatoria. En: López MTR, Grajales PJP, Guarín CJM (Eds.). *Inmunología. Una ciencia activa*. 2ª ed. 2009, pp. 117-119.
- Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Funez LA, de Gasper AL, Zeni ALB. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 164: 136-146.
- Tropicos®. Disponible en internet <http://www.tropicos.org/Name/9200131>. Consultado el 3 de abril, 2016.
- Truiti MDCT, Bersani-Amado CA, Dias Filho BP, Sarragiotto MH, de Souza MC. Screening of five Brazilian plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*. 2006; 44(7) 516-521.
- Uluçkan Ö, Guinea-Viniegra J, Jimenez M, Wagner EF. Signalling in inflammatory skin disease by AP-1 (Fos/Jun). *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2015; 33(4 Suppl. 92): S44-S49.
- van Buul JD, Hordijk PL. Endothelial adapter proteins in leukocyte transmigration. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 101(4): 649-655.
- Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research*. 1998; 47(Suppl. 2): S78-S87.

- Vargas Salazar MA. El factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con infliximab (un agente anti-FNT- α). *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2009; 67(590): 345-351.
- Vickery HB, Pucher GW. Organic acids of plants. *Annual Review of Biochemistry*. 1940; 9(1): 529-544.
- Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983; 80(14): 4518-4521.
- Wagner H, Blatt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Stuttgart: Springer; 1996. p 362.
- Wang D, DuBois RN. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2010; 10(3): 181-193.
- Wang Q, Kuang H, Su Y, Sun Y, Feng J, Gou R, Chan K. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013a; 146(1): 9-39.
- Wang WG, Du X, Li XN, Yan BC, Zhou M, Wu HY, Zhan R, Dong K, Pu JX, Sun HD. Four new diterpenoids from *Isodon eriocalyx* var. *laxiflora*. *Natural Products and Bioprospecting*. 2013b; 3(4): 145-149.
- Wang P, Guan PP, Guo C, Zhu F, Konstantopoulos K, Wang ZY. Fluid shear stress-induced osteoarthritis: roles of cyclooxygenase-2 and its metabolic products in inducing the expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *The FASEB Journal*. 2013c; 27(12): 4664-4677.
- Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 614.
- Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, Yoosook C, Rossi AG, Reutrakul V. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116(2): 234-244.

- Warren JS, Ward PA. The inflammatory response. En *Williams Hematology*. 2001; 6: 67-76.
Disponible en internet <https://medtextfree.wordpress.com/2011/12/20/chapter-6-the-inflammatory-response/>. Consultado el 15 de abril de 2016.
- Web 1: www.atcc.com. Consultado el 12 de noviembre de 2015.
- Web 2: www.laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-resonancia-magnetica-nuclear. Consultado el 23 de marzo de 2016.
- Weng ZY, Huang SX, Li ML, Zeng YQ, Han QB, Ríos JL, Sun HD. Isolation of two bioactive *ent*-kauranoids from the leaves of *Isodon xerophilus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(15): 6039-6043.
- Whittle BJ. Nitric oxide and the gut injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology*. 2003; 11(4-6): 415-422.
- Wiedeman HG, Bayer G. Papyrus. The paper of ancient Egypt. *Analytical Chemistry*. 1983; 55(12): 1220A-1230A.
- Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Advances in Wound Care*. 2013; 2(7): 379-388.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet*. 2000; 355(9204): 646-648.
- Wisniak J. Pierre-Jean Robiquet. *Educación Química*. 2013; 24(1): 139-149.
- Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*. 2009; 116(6): 451-465.
- Woo CWH, Man RYK, Siow YL, Choy PC, Wan EWY, Lau CS, Karmin O. *Ganoderma lucidum* inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005; 275(1-2): 165-171.
- Wu CY, Raven PH, Hong DY (eds.). Verbenaceae through Solanaceae. *Flora of China*. 17: 50-299. 1994. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis.
Disponible en internet http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=210000843.
Consultado el 20 de junio de 2016.

- Xiang CL, Liu ED. A new species of *Isodon* (Lamiaceae, Nepetoideae) from Yunnan province, southwest China. *Systematic Botany*. 2012; 37(3): 811-817.
- Xiao J, Capanoglu, E, Jassbi AR, Miron A. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015; 56(Suppl 1): S29-S45.
- Xiao X, Wang X, Gui X, Chen L, Huang B. Natural flavonoids as promising analgesic candidates: a systematic review. *Chemistry and Biodiversity*. 2016. En prensa. DOI: 10.1002/cbdv.201600060.
- Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*. 2002; 12(5-6): 311-320.
- Xu HZ, Huang Y, Wu YL, Zhao Y, Xiao WL, Lin QS, Sun HD, Dai W, Chen GQ. Pharicin A, a novel natural *ent*-kaurene diterpenoid, induces mitotic arrest and mitotic catastrophe of cancer cells by interfering with BubR1 function. *Cell Cycle*. 2010; 9(14): 2897-2907.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*. 2003; 4(11): 1144-1150.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2008; 4(5): 285-293.
- Yang Y, Sun H, Zhou Y, Ji S, Li M. Effects of three diterpenoids on tumour cell proliferation and telomerase activity. *Natural Product Research*. 2009; 23(11): 1007-1012.
- Yang J, Wang WG, Wu HY, Du X, Li XN, Li Y, Pu JX, Sun HD. Bioactive enmein-type *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon phyllostachys*. *Journal of Natural Products*. 2016; 79(1): 132-140.
- Yano S, Umeda D, Maeda N, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(14): 5203-5207.

- Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *European Journal of Nutrition*. 2007; 46(5): 257-263.
- Yao R, Chen Z, Zhou C, Luo M, Shi X, Li J, Gao Y, Zhou F, Pu JX, SunHD, He J. Xerophilusin B induces cell cycle arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells and does not cause toxicity in nude mice. *Journal of Natural Products*. 2015; 78(1): 10-16.
- Yesilada E, Tanaka S, Sezik E, Tabata M. Isolation of an anti-inflammatory principle from the fruit juice of *Ecballium elaterium*. *Journal of Natural Products*. 1988; 51(3): 504-508.
- Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*. 2009; 227(1): 54-65.
- Young JM, Wagner BM, Spires DA. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983; 80(1): 48-52.
- Yu F, Takahashi T, Moriya J, Kawaura K, Yamakawa J, Kusaka K, Itoh T, Morimoto S, Yamaguchi N, Kanda T. Traditional Chinese medicine and Kampo: a review from the distant past for the future. *The Journal of International Medical Research*. 2006; 34(3): 231-239.
- Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M, Li D. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 15(2): 143-152.
- Yueqin Z. Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias (tesis doctoral). Valencia (España): Universitat de Valencia; 2007.
- Yúfera EP. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Barcelona: Editorial Reverté. 1995, pp. 859-861.
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*. 2000; 6(5): 347-373.

- Zamudio-Arroyo JM, Peña-Rangel MT, Riesgo-Escovar JR. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2012; 15(2): 133-141.
- Zeng P, Zhang Y, Pan C, Jia Q, Guo F, Li Y, Zhu W, Chen K. Advances in studying of the pharmacological activities and structure–activity relationships of natural C-glycosylflavonoids. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013; 3(3): 154-162.
- Zhang M, Zhang Y, Lu W, Nan FJ. Synthesis and revision of stereochemistry of rubescensin S. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2011; 9(12): 4436-4439.
- Zhang X, Shang P, Qin F, Zhou Q, Gao B, Huang H, Yang H, Shi H, Yu LL. Chemical composition and antioxidative and anti-inflammatory properties of ten commercial mung bean samples. *LWT-Food Science and Technology*. 2013; 54(1): 171-178.
- Zhang J, Kong LM, Zhan R, Ye ZN, Pu JX, Sun HD, Li Y. Two natural *ent*-kauranoids as novel Wnt signaling inhibitors. *Natural Products and Bioprospecting*. 2014; 4(3): 135-140.
- Zhao W, Pu JX, Du X, Wu YL, Zhao Y, He F, Zhang HB, Xue YB, Xiao WL, Chen GQ, Sun HD. Chemical constituents from the aerial parts of *Isodon coetsa* and their cytotoxicity. *Archives of Pharmacal Research*. 2011a; 34(12): 2007-2014.
- Zhao W, Pu JX, Du X, Su J, Li XN, Yang JH, Xue YB, Li Y, Xiao WL, Sun HD. Structure and cytotoxicity of diterpenoids from *Isodon adenolomus*. *Journal of Natural Products*. 2011b; 74(5): 1213-1220.
- Zhou Q, Liao J K. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2010; 74(5): 818-826.
- Zhou L, Sun L, Wu H, Zhang L, Chen M, Liu J, Zhong R. Oridonin ameliorates lupus-like symptoms of MRL lpr/lpr mice by inhibition of B-cell activating factor (BAFF). *European Journal of Pharmacology*. 2013; 715(1-3): 230-237.
- Zucolotto SM, Goulart S, Montanher AB, Reginatto FH, Schenkel EP, Fröde TS. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica*. 2009; 75(11): 1221-1226.

Zurier RB. Prostaglandins, leukotrienes, and related compounds. En: Mackay IR, Rose NR, Diamond B, Davidson A (Eds.) *Encyclopedia of Medical Immunology*. New York: Springer. 2014, pp. 905-916.