



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN IN VITRO DE COMPUESTOS PRESENTES EN  
*Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* FRENTE A  
ENZIMAS DE DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA**

**Diana Carolina Jaimes Galvis**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
2010

**EVALUACIÓN IN VITRO DE COMPUESTOS PRESENTES EN  
*Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* FRENTE A  
ENZIMAS DE DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA**

**Diana Carolina Jaimes Galvis**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director (a):  
Ph.D., Luis Fernando Ospina Giraldo

Grupo de Investigación:  
Principios Bioactivos de Plantas Medicinales

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
2010

## RESUMEN

En el presente trabajo se implementaron técnicas *in vitro* con el fin de contribuir al estudio farmacológico de principios activos de plantas medicinales colombianas con potencial antiinflamatorio como: ayapina, aislada de *Critoniella acuminata*, amarisolide y arbutina aisladas de *Salvia rubescens* previamente en el Grupo de Investigación de Principios Bioactivos de Plantas.

Se evaluaron enzimas relacionadas con el proceso de desgranulación leucocitaria: Mieloperoxidasa, Elastasa, Lisozima y Betaglucuronidasa; determinando el potencial efecto inhibitorio directo sobre la enzima y/o la inhibición de la desgranulación de los Polimorfonucleares. De esta forma, retendimos contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de estos compuestos.

Amarisolide presentó inhibición de mieloperoxidasa, lisozima y betaglucuronidasa. Ayapina inhibió la elastasa, lisozima y betaglucuronidasa; mientras que Arbutina sólo presentó inhibición de mieloperoxidasa.

Los resultados hacen suponer que los mecanismos de acción por los cuales estos compuestos ejercen parte de su efecto antiinflamatorio están relacionados con la inhibición de enzimas de desgranulación leucocitaria.

**Palabras clave:** inflamación, mieloperoxidasa, elastasa, lisozima, betaglucuronidasa, *Salvia rubescens*, *Critoniella acuminata*, amarisolide, ayapina, arbutina.

## ABSTRAC

Presently work was implemented in vitro techniques with the purpose of contributing to the pharmacological study of active principles of Colombian medicinal plants with anti-inflammatory potential as: ayapina, isolated of *Critoniella acuminata*, amarisolide and isolated arbutina of Sage *rubescens* previously in the Group of Investigation of Principles Bioactivos of Plants.

Enzymes related with the process of leucocyte degranulation were evaluated: Myeloperoxydase, Elastase, Lisozime and Betaglucuronydase; determining the potential direct inhibitory effect on the enzyme and/or the inhibition of the desgranulation of the leucocyte.

This way, we sought to contribute to the knowledge of the mechanism of action of these compounds. Amarisolide presented mieloperoxidase inhibition, lisozime and betaglucuronydase. Ayapina inhibited elastase, lisozime and betaglucuronidase; while Arbutina only presented mieloperoxidasa inhibition.

The results make suppose that the action mechanisms for which these compounds exercise part of their anti-inflammatory effect are related with the inhibition of enzymes of leucocyte degranulation.

**Words key:** inflammation, myeloperoxydase, elastase, lisozime, betaglucuronydase, Sage *rubescens*, *Critoniella acuminata*, amarisolide, ayapina, arbutina.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1. Capítulo 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
1.1. Generalidades del proceso inflamatorio.....	3
1.2. Mediadores Inflamatorios.....	6
1.2.1. Citocinas.....	6
1.2.2. Quimiocinas.....	7
1.2.3. Óxido nítrico.....	7
1.2.4. Derivados del ácido araquidónico.....	7
1.2.5. Fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	8
1.3. Principales células presentes en la inflamación.....	8
1.3.1. Los monocitos.....	9
1.3.2. Los linfocitos.....	9
1.3.3. Los mastocitos.....	9
1.3.4. Los macrófagos.....	9
1.3.5. Leucocitos Polimorfonucleares .....	10
1.3.5.1. El eosinófilo.....	10
1.3.5.2. El basófilo.....	11
1.3.5.3. El neutrófilo.....	11
1.3.5.3.1. Migración .....	12
1.3.5.3.2. Diapédesis.....	13
1.3.5.3.3. Quimiotaxis.....	14
1.3.5.3.4. Fagocitosis.....	14
1.3.5.3.5. Muerte intracelular.....	15
1.3.5.3.5.1. Explosión respiratoria.....	15
1.3.5.3.5.2. Desgranulación leucocitaria.....	16
1.3.5.3.6. Apoptosis.....	19
1.4. Patologías asociadas con la actividad del neutrófilo.....	19
<b>2. Capítulo 2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>20</b>
2.1. Reclutamiento de PMNs humanos.....	21
2.2. Viabilidad celular.....	21
2.2.1. Técnica de azul de Tripán.....	21
2.3. Citotoxicidad.....	21
2.3.1. Ensayo del MTT.....	22
2.3.2. Ensayo de resazurina.....	22
2.4. Actividad enzimática.....	23
2.4.1. Actividad MPO.....	23
2.4.2. Actividad elastasa.....	23

2.4.3.	Actividad lisozima.....	24
2.4.4.	Actividad betaglucuronidasa.....	24
2.4.5.	Desgranulación leucocitaria.....	24
2.5.	Análisis estadístico.....	25
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. ESPECIES VEGETALES.....</b>	<b>25</b>
3.1.	<i>Critoniella acuminata</i> .....	25
3.1.1.	Ayapina.....	26
3.2.	<i>Salvia rubescens</i> .....	27
3.2.1.	Arbutina.....	28
3.2.2.	Amarisolide.....	28
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>Capítulo 5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Materiales y reactivos.....	31
5.1.1.	Reactivos biológicos.....	31
5.1.2.	Reactivos químicos.....	31
5.1.3.	Solventes.....	32
5.1.4.	Equipos.....	32
5.1.5.	Soluciones.....	32
5.2.	Reclutamiento de PMNs.....	33
5.2.1.	Obtención de PMNs humanos.....	33
5.2.2.	Recuento celular.....	34
5.2.3.	Viabilidad celular.....	35
5.3.	Citotoxicidad.....	36
5.3.1.	Ensayo del MTT.....	36
5.3.2.	Ensayo de Resazurina.....	36
5.4.	Actividad enzimática leucocitaria.....	37
5.4.1.	Obtención de fuente de enzimas neutrofílicas.....	38
5.4.2.	Actividad MPO.....	38
5.4.2.1.	Evaluación actividad enzimática MPO.....	38
5.4.2.2.	Evaluación del proceso de desgranulación leucocitaria MPO.....	39
5.4.3.	Actividad elastasa.....	40
5.4.3.1.	Evaluación actividad enzimática elastasa.....	41
5.4.3.2.	Evaluación del proceso de desgranulación leucocitaria elastasa.....	41
5.4.4.	Actividad lisozima.....	42
5.4.4.1.	Evaluación actividad enzimática lisozima.....	42
5.4.4.2.	Evaluación del proceso de desgranulación leucocitaria lisozima.....	43
5.4.5.	Actividad betaglucuronidasa	
5.4.5.1.	Evaluación actividad enzimática	

betaglucuronidasa.....	44
5.4.5.2.    Evaluación del proceso de desgranulación leucocitaria betaglucuronidasa.....	45
<b>6. Capítulo 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
6.1. Reclutamiento de PMNs.....	47
6.1.1.    PMNs humanos.....	47
6.2. Determinación de citotoxicidad.....	47
6.2.1.    Ensayo del MTT y Resazurina.....	48
6.3. Actividad enzimática.....	50
6.3.1.    Actividad MPO.....	50
6.3.1.1.    Inhibición enzimática.....	50
6.3.1.2.    Inhibición de la desgranulación leucocitaria.....	52
6.3.2.    Actividad elastasa.....	53
6.3.2.1.    Inhibición enzimática.....	53
6.3.2.2.    Inhibición de la desgranulación leucocitaria.....	55
6.3.3.    Actividad lisozima.....	56
6.3.3.1.    Inhibición enzimática.....	56
6.3.3.2.    Inhibición de la desgranulación leucocitaria	
6.3.4.    Actividad betaglucuronidasa.....	62
6.3.4.1.    Inhibición enzimática.....	62
6.3.4.2.    Inhibición de la desgranulación leucocitaria.....	64
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>
<b>A. Anexo. Resumen de resultados.....</b>	<b>76</b>
<b>B. Anexo. Citotoxicidad de los compuestos sobre PMNs     humanos: ensayo del MTT.....</b>	<b>77</b>
<b>C. Anexo. Citotoxicidad de los compuestos sobre PMNs     humanos: ensayo de Resazurina.....</b>	<b>78</b>
<b>D. Anexo. Inhibición actividad enzimática MPO.....</b>	<b>79</b>
<b>E. Anexo. Inhibición de la desgranulación leucocitaria –     actividad MPO.....</b>	<b>80</b>
<b>F. Anexo. Inhibición actividad enzimática elastasa.....</b>	<b>81</b>
<b>G. Anexo. Inhibición de la desgranulación leucocitaria –     actividad elastasa.....</b>	<b>82</b>
<b>H. Anexo. Inhibición actividad enzimática lisozima pura.....</b>	<b>83</b>
<b>I. Anexo. Inhibición actividad lisozima obtenida de fuente     Enzimática.....</b>	<b>84</b>
<b>J. Anexo. Inhibición de la desgranulación leucocitaria –</b>	

actividad lisozima.....	85
<b>K. Anexo.</b> Determinación actividad lisozima pura.....	86
<b>L. Anexo.</b> Inhibición actividad enzimática betaglucuronidasa.....	87
<b>M. Anexo.</b> Inhibición de la desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa.....	88
<b>N. Anexo.</b> Determinación de volúmenes para determinación actividad betaglucuronidasa.....	89



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3-1.</b> Estructura de ayapina.....	26
<b>Figura 3-2.</b> Estructura de arbutina.....	28
<b>Figura 3-3.</b> Estructura de amarisolide.....	28

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1-1.</b> Papel central del neutrófilo como respuesta inmune.....	12
<b>Gráfica 1-2.</b> Respuesta inflamatoria inmune.....	13
<b>Gráfica 6-3.</b> Curva de calibración para la determinación de la concentración de Resazurina con PMNs.....	48
<b>Gráfica 6-4.</b> Efecto de los compuestos sobre PMNs humanos en ensayo por MTT y por Resazurina.....	49
<b>Gráfica 6-5.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática MPO.....	51
<b>Gráfica 6-6.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad MPO.....	52
<b>Gráfica 6-7.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática elastasa.....	54
<b>Gráfica 6-8.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad elastasa.....	55
<b>Gráfica 6-9.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática lisozima.....	58
<b>Gráfica 6-10.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima.....	61
<b>Gráfica 6-11.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática betaglucuronidasa.....	63
<b>Gráfica 6-12.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad betaglucuronidasa.....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b> Principales mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria.....	6
<b>Tabla 5-2.</b> Protocolo experimental para la obtención de PMNs Humanos.....	34
<b>Tabla 5-3.</b> Protocolo para la determinación de citotoxicidad por MTT...	36
<b>Tabla 5-4.</b> Protocolo para la determinación de citotoxicidad por Resazurina .....	37
<b>Tabla 5-5.</b> Protocolo para la obtención de fuente enzimática.....	38
<b>Tabla 5-6.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad MPO .....	39
<b>Tabla 5-7.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad MPO .....	40
<b>Tabla 5-8.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad elastasa.....	41
<b>Tabla 5-9.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad elastasa .....	41
<b>Tabla 5-10.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad lisozima.....	43
<b>Tabla 5-11.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad Lisozima.....	44
<b>Tabla 5-12.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad betaglucuronidasa .....	45
<b>Tabla 5-13.</b> Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad Betaglucuronidasa .....	46
<b>Tabla 6-14.</b> Viabilidad de PMNs en presencia de los compuestos en	50

estudio .....	
<b>Tabla 6-15.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática MPO.....	51
<b>Tabla 6-16.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad MPO.....	53
<b>Tabla 6-17.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática elastasa.....	54
<b>Tabla 6-18.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad elastasa.....	55
<b>Tabla 6-19.</b> Determinación de la actividad de lisozima pura sobre PMNs humanos.....	57
<b>Tabla 6-20.</b> Efecto de los compuestos sobre una fuente enzimática con actividad lisozima y lisozima pura.....	58
<b>Tabla 6-21.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima.....	61
<b>Tabla 6-22.</b> Determinación de volúmenes para evaluar la actividad Betaglucuronidasa.....	62
<b>Tabla 6-23.</b> Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática Betaglucuronidasa.....	63
<b>Tabla 6-24.</b> Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad betaglucuronidasa.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
BK	Bradicinina
CPD	Citrato fosfato dextrosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
HBSS	Solución salina buferizada de Hanks
IL	Interleucina
LT	Leucotrieno
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazoilo
NO	Óxido nítrico
PAF	Factor de agregación plaquetaria
PBS	Solución salina fosfatada
PG	Prostaglandinas
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMNs	Leucocitos Polimorfonucleares
EOR	Especies oxígeno reactivas
TMB	Tetrametilbencidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TX	Tromboxanos
T-BOC	n- $\alpha$ -Ter-butoxi-BOC-L-alanil-p-nitrofeniléster

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es uno de los mecanismos básicos de defensa de los organismos pluricelulares frente a una agresión, en donde el tejido conjuntivo vascularizado reacciona frente a un daño tisular con el propósito de localizar y eliminar el agente nocivo e iniciar la reparación tisular. La inflamación está regulada por varios mediadores químicos, entre otros la síntesis de citocinas pro- inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, IL18, TNF- $\alpha$ , formación de óxido nítrico por el macrófago y el endotelio, formación de radicales libres por mecanismos dependientes de oxígeno, activación de la vía del ácido araquidónico y la consecuente formación de prostaglandinas y tromboxanos (Pepper, 2005).

La inflamación está implicada en múltiples patologías tales como artritis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y aterosclerosis (Moutaery, 2005; Raghav y col., 2006). Durante esta respuesta del organismo es esencial el papel de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), que son las células leucocitarias predominantes en la inflamación aguda y son las primeras células móviles en llegar al área afectada, se adhieren a las células epiteliales y atraviesan la pared de los vasos sanguíneos atraídos por factores quimiotácticos para desgranular - liberar enzimas que degradan el agente invasor, lo cual resulta positivo si éste es de origen bacteriano, pero potencialmente nocivo si el proceso es exagerado, porque puede dañar el tejido normal. Encontrar la forma de limitar la desgranulación leucocitaria equivale a encontrar un antiinflamatorio útil de tipo inmunomodulador, es decir que además interviene el sistema inmune, estimulándolo o reprimiéndolo (Franco, 2006).

Existen tres tipos de leucocitos PMNs denominados basófilos, eosinófilos y neutrófilos. El **Neutrófilo** es un componente central del proceso inflamatorio, siendo la primera línea de defensa entre todos los elementos celulares implicados en la reacción inflamatoria frente al ataque por microorganismos, teniendo la habilidad de migrar hacia el sitio de la inflamación liberando productos tóxicos tales como enzimas proteolíticas, especies de oxígeno reactivas (EOR) y proteínas catiónicas capaces de destruir los patógenos invasores (Daniel y Van Dyke, 1996). Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en los tejidos deben ser atribuidos a la liberación del contenido de sus gránulos (Franco, 2006). Los blancos

del neutrófilo incluyen bacterias, hongos, virus, células infectadas por virus y células tumorales (Ferrándiz y Bustos, 1993).

La respuesta del neutrófilo en la defensa del organismo contra microorganismos invasores o daños tisulares incluye la migración, la diapédesis, la quimiotaxis, la fagocitosis, la muerte intracelular y la apoptosis.

En este trabajo se hace una revisión del proceso inflamatorio agudo junto con indicadores de niveles enzimáticos como Mieloperoxidasa (MPO), Elastasa, Betaglucuronidasa y Lisozima en la actividad del neutrófilo como componente central de la respuesta inflamatoria aguda. Además, se describen las técnicas *in vitro* empleadas en la evaluación de compuestos como Ayapina, presente en *Critoniella acuminata* y Arbutina y Amarisolide presentes en *Salvia rubescens*, con el fin de ampliar su perfil farmacológico y determinar su actividad sobre la desgranulación leucocitaria y/o actividad enzimática.

Los productos de origen natural, en especial los obtenidos de fuentes vegetales, se han constituido en uno de los principales recursos de obtención de sustancias con potencial actividad farmacológica. Desde hace algunos años, países desarrollados y en vía de desarrollo han retomado y desarrollado el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la "revolución verde de la medicina" (García y col., 2002). Colombia, con menos del 1% del territorio del planeta, cuenta con el 10% de la biodiversidad mundial (McWilliams, 2003); por ello, nuestro país representa una fuente importante para la búsqueda de fármacos en fuentes vegetales.

# 1. Capitulo 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con el fin de comprender mejor el proceso inflamatorio, los eventos vasculares, eventos celulares, los mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria y el esencial papel de los Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs) en la defensa del organismo, a continuación se hace una conceptualización del proceso junto con una breve revisión de las especies vegetales que han de ser estudiadas en el presente trabajo de investigación.

## 1.1. GENERALIDADES DEL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un proceso bioquímico básico para eliminar estímulos que comprometen el organismo vivo (estímulos infecciosos, físicos, químicos o traumáticos) (Srinivasan y col., 2001). Es una respuesta del organismo que se produce cuando células pertenecientes al sistema inmunológico se activan en respuesta a estos estímulos. La inflamación está implicada en múltiples patologías tales como artritis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y aterosclerosis (Morley y col., 2006; Raghav y col., 2006; Saleem y col., 2006).

Los signos macroscópicos cardinales de la inflamación son: calor, rubor (eritema), tumor (edema) y dolor (hiperalgesia), acompañados muchas veces de deterioro o pérdida de una función (ej. Insuficiencia hepática en la hepatitis, inmovilidad articular en la artritis). El calor y el eritema se deben a los eventos vasculares tempranos de vasodilatación y aumento del riego sanguíneo. El edema está relacionado estrechamente con el aumento de la permeabilidad capilar que permite la formación de exudado (plasma y proteínas plasmáticas más acúmulo de células inflamatorias). El dolor es causado por estimulación de fibras sensoriales ante el aumento de presión en el foco inflamatorio y la liberación de neurocininas. En general, estos signos y síntomas resultan de la acción de mediadores tales como histamina, bradiginina, neurocininas, factores del complemento y óxido nítrico, que se originan localmente o provienen de células infiltradas al sitio de la agresión. Una elevada producción de prostaglandinas resalta y prolonga el efecto de los mediadores proinflamatorios iniciales (Smith y col., 1998; Ager, 2003).

La respuesta inflamatoria del hospedador involucra una interacción de



alta complejidad entre múltiples factores a nivel humoral, celular y neuronal, que se refleja en una serie de fenómenos microscópicos integrados: vasodilatación arteriolar y aumento de la permeabilidad vascular, e interacciones entre leucocitos y endotelio que permitan la diapédesis y migración leucocitaria hacia el tejido lesionado (foco o “escenario” inflamatorio) (Cirino, 1998). El proceso inflamatorio tiene por objetivo destruir o inactivar el agente pro-inflamatorio que haya desencadenado la inflamación, facilitando la reparación de los tejidos lesionados (Guzik y col., 2003; Rojas, 2007).

En el proceso inflamatorio participan diversos tipos celulares y mediadores químicos que interactúan entre sí en una red compleja y altamente coordinada. Básicamente, se distinguen dos tipos de eventos: los vasculares y los celulares. Los eventos vasculares (vasodilatación arteriolar, con la consiguiente hiperemia tisular e incremento de la permeabilidad vascular en capilares y vénulas) son el requisito previo para que las células circulantes puedan acceder al foco inflamatorio (Ospina, 2000).

La **Primera fase** inicia gracias a los PMNs y macrófagos liberados, los cuales liberan TNF, IL-1 y otros mediadores que activan el endotelio de los vasos que irrigan el sitio afectado y a los mastocitos cercanos que a la vez liberan Histamina que refuerza la activación del endotelio. La activación del endotelio libera quimiocinas que atraen a los PMNs, los cuales se adhieren al endotelio y migran a tejidos, para asegurar la llegada de fagocitos al sitio de la lesión (Rojas y col., 2007). Ante un estímulo inflamatorio, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar tienen un inicio inmediato y permanecen durante las primeras horas del proceso inflamatorio. La finalidad subyacente a estos eventos es permitir el mayor flujo sanguíneo portador de células inflamatorias circulantes y la extravasación de plasma con proteínas para la formación de exudado. La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar son provocados por “mediadores de acción directa” que son liberados por células del tejido circundante y que interactúan con receptores específicos sobre las células endoteliales. Entre estos mediadores químicos se encuentran histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos C4 y D4 (LTC4 y LTD4), factor de agregación plaquetaria (PAF) y sustancia P (Ospina, 2000). Las prostaglandinas E2 e I2 (PGE2 y PGI2) producen relajación de la musculatura lisa vascular y, aunque en muchos tejidos no aumentan la permeabilidad vascular, potencian el edema producido por otros mediadores iniciales como la histamina y la bradicinina (BK) (Texeira y col., 1995).

A la amplificación de la respuesta inflamatoria contribuyen en forma importante la interacción de múltiples mediadores plasmáticos

generados en cuatro sistemas enzimáticos de activación en cascada: el del complemento, el de la coagulación, el de la fibrinólisis y el de las cininas (Ospina, 2000).

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos, ubicadas en la pared de las arteriolas, regulan el tono y permeabilidad de los vasos, además participan en el control de la coagulación y la agregación plaquetaria. Producen óxido nítrico, también conocido como factor relajante derivado del endotelio, el cual produce vasodilatación al relajar la musculatura lisa de la pared de los vasos; también producen cantidades importantes de prostaciclina, PAF, factores activadores del plasminógeno y citocinas como IL-1 e IL-8, además de expresar distintas moléculas de adhesión fundamentales para la migración celular. Se activan por diversos mediadores químicos especialmente histamina y acetilcolina (Franco, 2006).

En la **Segunda Fase** participan los macrófagos y linfocitos que también se adhieren al endotelio y migran a tejidos. En la **Tercera Fase** (Fase de Resolución) interactúan los macrófagos y fibroblastos buscando reparar los daños causados por el agente invasor o la lesión. La inflamación aguda finaliza por la apoptosis de las células participantes y por la fagocitosis del microorganismo invasor, cuando el proceso es de origen infeccioso. Si esto no sucede o fallan mecanismos homeostáticos, el proceso conlleva a una inflamación crónica acompañada de daño tisular (Rojas y col., 2007).

## 1.2. MEDIADORES INFLAMATORIOS

Tabla 1-1. Principales mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria.

Origen	Mediador
Mastocitos y basófilos	Histamina y serotonina
Kininógeno	Bradikinina
Fibrinógeno	Fibrinopéptidos
Complemento C3	C3a
Complemento C5	C5a
Membrana celular	Prostaglandinas
Leucocitos	Leucotrieno B4
Leucocitos, mastocitos	Leucotrieno C4,D4,E4
Leucocitos	Prot. catiónicas lisosómicas
Leucocitos	Proteasas neutras lisosómicas
Leucocitos	Metabolitos de oxígeno
Leucocitos y otras	Factor activador plaquetas
Macrófagos y otras	IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$
Macrófagos y otras	Oxido Nítrico

Adaptado de Rojas y col., 2007

### 1.2.1. Citocinas

Las citocinas son proteínas (usualmente glicoproteínas). Son los comunicadores primarios en la respuesta inmune innata que sirven como mensajeros químicos entre las células, y están involucradas en procesos como crecimiento celular y diferenciación, reparación y remodelación tisulares y regulación del sistema inmune (Dinarello, 2000; Oberholzer y col., 2000; Rossi y Zlontnik, 2000).

Son producidas por la mayoría de las células nucleadas. No existen como moléculas almacenadas. Inician su acción al unirse a receptores específicos de superficie en las células blanco con transducción de señales extracelulares y cambios en procesos intracelulares. La expresión de los receptores de citocinas está regulada por señales celulares permitiendo retroalimentación positiva o negativa. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- alfa), interleucina 1 (IL- 1) e IL- 6 son las tres citocinas que al parecer juegan un papel importante en la iniciación y regulación de la respuesta inmune adquirida, especialmente sobre respuestas de linfocitos colaboradores tipo 1 (LT helper, LTh1) (Oberholzer y col., 2000).

El papel central de las citocinas es el control de la dirección, amplitud y duración de la respuesta inmune y el control del remodelamiento de

tejidos, desarrollo programado, constitutivo o no programado. Este último se encuentra asociado a procesos inflamatorios de infección, cicatrización y reparación (Tanigushi, 1995).

Desde el punto de vista de la inflamación, las citocinas se dividen en dos grupos: citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias. Las primeras son producidas por macrófagos activados y están involucradas en la regulación positiva de la reacción inflamatoria. Las citocinas antiinflamatorias se derivan de las células T y están involucradas en la regulación negativa de la reacción inflamatoria (Paul y Seder, 1994).

### **1.2.2. Quimiocinas**

Las quimiocinas son citocinas con gran capacidad quimiotáctica, son proteínas de bajo peso molecular involucradas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos: tráfico de linfocitos, reparación de heridas, desarrollo de linfocitos Th1 y Th2, angiogénesis y angiostaxis, metástasis, desarrollo de órganos linfoides y propagadores de reacciones inflamatorias (Rossi y Zlotnik, 2000). En relación con migración leucocitaria, la acción de las quimiocinas se traduce en activación de integrinas, permitiendo la adhesión y migración. Las quimiocinas inflamatorias son producidas por diferentes tipos celulares: endotelio, epitelio, células estromales y leucocitos. Todas las quimiocinas son moléculas secretadas, excepto fractalcina (proteína transmembrana) (Sallusto y Lanzavecchia, 2000).

### **1.2.3. Óxido Nítrico**

El óxido nítrico (NO) al ser producido en cantidades elevadas pierde su papel protector en oxidación celular, adquiriendo carácter oxidativo y lesivo, ya sea por acción directa o mediante la acción de especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Liaudet y col., 2000). Por la importancia del NO en procesos inflamatorios, se han desarrollado estrategias farmacológicas tales como inhibición selectiva de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), atrapadores de peroxinitrito, acción sobre blancos retardados de citotoxicidad por NO/peroxinitrito (Hobbs y col., 1999; Liaudet y col., 2000).

### **1.2.4. Derivados de Ácido Araquidónico (AA)**

La enzima COX, o prostaglandina H sintetasa, emplea ácido araquidónico (AA) como sustrato, formando mediadores llamados

eicosanoides (prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT). Los eicosanoides se unen a receptores de superficie celular vía receptores acoplados a proteínas G (GCRP) y AMP cíclico. Se han descrito dos isoformas: COX-1 o constitutiva, localizada a nivel subcelular en la membrana del retículo endoplasmático. COX-2 o inducible que se produce en eventos inflamatorios y predomina en células inflamatorias, localizada en la membrana nuclear (Cirino, 1998).

El Ácido Araquidónico AA es un ácido graso, en el organismo este ácido es almacenado en forma esterificada en la membrana celular de casi todas las células y es liberado en respuesta a un estímulo como histamina, entre otros (Valenzuela, 2007).

### **1.2.5. Fosfolipasa A<sub>2</sub>**

El término fosfolipasa se refiere a un grupo heterogéneo de enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar una o más uniones éster en glicerofosfolípidos. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> comprenden una amplia familia de enzimas lipolíticas que hidrolizan la unión éster de glicerofosfolípidos para producir ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Valenzuela, 2007). La membrana celular posee AA esterificado en fosfolípidos de membrana, el cual es movilizado por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), permitiendo que el AA sea posteriormente sustrato de COX. La producción de AA es el paso limitante en la producción de PG (Cirino, 1998).

La PLA<sub>2</sub> participa en una variedad de procesos fisiológicos tales como digestión de fosfolípidos, señalización lipídica, remodelamiento de membranas celulares, entre otros.

## **1.3. PRINCIPALES CÉLULAS PRESENTES EN LA INFLAMACIÓN**

En los eventos celulares de acuerdo con el estatus de movilidad, las células participantes en el proceso inflamatorio pueden considerarse como residentes (asentadas permanentemente en los tejidos, ej. Células endoteliales vasculares y células perivasculares como mastocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos) o circulantes (acceden al foco inflamatorio desde el torrente sanguíneo, ej. Plaquetas, neutrófilos, monocitos) (Ospina, 2000).

### **1.3.1. Los Monocitos**

Son células móviles de acción tardía, que actúan varias horas después de que lo han hecho los PMNs. En el tejido afectado, se transforman en macrófagos y fagocitan cualquier resto celular o bacteriano del área. Son “recicladores” que limpian los restos de la batalla citoquímica desatada durante la inflamación. También son capaces de secretar enzimas y mediadores químicos (Franco, 2006).

### **1.3.2. Los Linfocitos**

Son las células de la respuesta inmunitaria específica que se desencadena en gran parte del proceso inflamatorio. Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grupos, linfocitos B y linfocitos T, dependiendo de si los progenitores linfoides maduran en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente. Participan en la inflamación por medio de las moléculas que producen: anticuerpos (activan el sistema de complemento) y linfocinas (activan la producción y función de las demás células que participan en la inflamación (Franco, 2006).

### **1.3.3. Los Mastocitos**

Están situados estratégicamente en los lugares más susceptibles de penetración de agentes patógenos como las proximidades a la piel, alrededor de los vasos sanguíneos y en las mucosas. Se activan por diversos estímulos como traumatismos o agresiones físicas o químicas. Esta activación conlleva a su desgranulación liberando grandes cantidades de histamina y serotonina lo que incrementa la permeabilidad vascular y también liberan algo de heparina. Pueden llegar a vivir varias semanas. También producen algunas prostaglandinas como la PGD<sub>2</sub> y leucotrienos y factor activador de las plaquetas (PAF) (Ferrándiz, 2002).

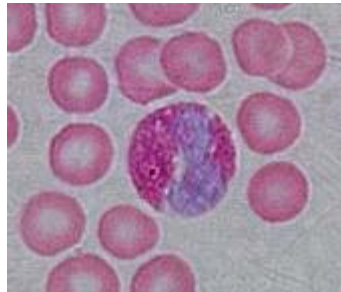
### **1.3.4. Los Macrófagos**

Llamados así por su importante papel en la fagocitosis tanto de agentes infecciosos como de los complejos antígeno-anticuerpo y restos celulares, son fundamentales en los procesos de reparación. Constituyen una de las más importantes células efectoras en la respuesta inflamatoria, donde juegan un papel importante en la iniciación, mantenimiento y control de la respuesta inmune primaria y secundaria. (Franco, 2006).

### 1.3.5. Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs)

Son las células leucocitarias predominantes o más abundantes en la inflamación aguda y son las primeras células móviles en llegar al área afectada. Se adhieren a las células epiteliales y atraviesan la pared de los vasos sanguíneos atraídos por factores quimiotácticos (Freitas y col., 2007). Existen tres tipos de leucocitos polimorfonucleares denominados neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Contienen lisosomas con un contenido rico de enzimas hidrolíticas muy agresivas; son capaces de generar una gran cantidad del radical superóxido y si su acción no se limita, estos radicales no solo son capaces de destruir el agente agresor sino también a las células normales del tejido inflamado (Franco, 2006).

#### 1.3.5.1. El Eosinófilo



Es un leucocito de tipo granulocito pequeño derivado de la médula ósea, es característico su núcleo bilobulado, al igual que sus distintivos gránulos citoplásmicos.

Son principalmente células residentes que abundan en tejidos con superficie epitelial, tiene una vida media en la circulación sanguínea de 3 a 4 días antes de migrar a los tejidos en donde permanecen durante varios días. Su desarrollo en la médula ósea es estimulado por diversas interleucinas, como la IL-5, la IL-3 y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago. Podrían sobrevivir varios días ante estímulos como la IL-5 (esencial para la eosinofilia tisular o sanguínea) y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). La patogénesis de la inflamación alérgica humana (en piel, ojos, nariz y pulmones) se asocia frecuentemente con la mayor presencia de eosinófilos y sus productos, y se correlaciona con la severidad de enfermedades como el asma. La acumulación de eosinófilos en los tejidos es característica de las reacciones locales de defensa del hospedador frente a infecciones por parásitos como los helmintos, para cuya eliminación el eosinófilo cuenta con gránulos que secretan agentes tóxicos como la proteína básica mayor, la cual es además tóxica para el epitelio pulmonar. En el reclutamiento selectivo de eosinófilos participa el agente quimiotáctico denominado eotaxina, una

quimiocina específica para los eosinófilos pero no para los neutrófilos (Texeira y col., 1995).

### 1.3.5.2. El Basófilo



Esta célula se tiñe fácilmente con colorantes. Los gránulos de los basófilos son gruesos pero escasos. Son células de unas 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y su núcleo tiene una forma que recuerda a una S. Se originan en el mismo lugar que el resto de los granulocitos (médula ósea), y son los menos numerosos, ya que constituyen sólo el 0,5% del total. Al activarse y pasar a los tejidos, se les llaman células cebadas o mastocitos. Tienen una activa participación en la respuesta inmunitaria, a través de la liberación de histamina, serotonina en bajas concentraciones y otras sustancias químicas. Son los granulocitos no fagocíticos más pequeños circulantes (Goldsby, 2004).

### 1.3.5.3. El Neutrófilo

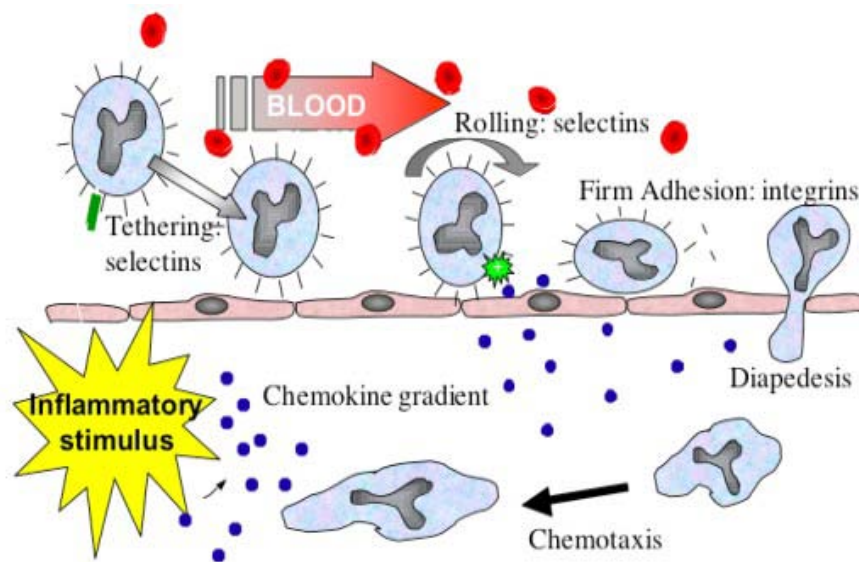


Los neutrófilos son glóbulos blancos de tipo granulocito, miden de 12 a 18  $\mu\text{m}$  y es el tipo leucocito más abundante en la sangre humana (60 a 75%), se denominan neutrófilos debido a que no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos. Participan activamente en la respuesta del huésped en su defensa natural (Costa y col., 2005). Son un componente central del proceso inflamatorio teniendo la habilidad para migrar hacia el sitio de la inflamación para liberar productos tóxicos tales como enzimas





endotelio, de esta manera el endotelio queda revestido de leucocitos. Tanto la captura, selección de leucocitos de la sangre circulante, como el enrollamiento a través de paredes de células endoteliales involucra glicoproteínas adhesivas denominadas selectinas, integrinas e inmunoglobulinas (Liu y col., 2004).



Tomado de [www.sci.ccnycunyc.edu/~lima/case6.html](http://www.sci.ccnycunyc.edu/~lima/case6.html)

## Gráfica 1-2. Respuesta inflamatoria aguda.

Las integrinas junto con las inmunoglobulinas son fundamentales en el proceso de adherencia y migración del leucocito a través del endotelio. Las integrinas son proteínas heterodiméricas constituidas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas glicoproteínas se expresan sobre la superficie de los leucocitos para mediar adhesiones leucocito-endotelio pocos minutos después de la activación por mediadores como PAF, IL-8, fMLP, C5a, citocinas y factores de crecimiento (TNF o GM-CSF) (Costa y col., 2005).

### 1.3.5.3.2. Diapédesis

La salida al espacio extravascular de PMNs a través de células endoteliales se conoce como diapédesis. El paso del leucocito a través del endotelio vascular ocurre preferencialmente en uniones tricelulares. Aunque no se conocen los mecanismos de extravasación, se sabe que la selectina se regula corriente abajo y que la molécula de adhesión

celular plaqueta-endotelio (PECAM-1) llega a un jugar un papel fundamental para el paso de PMNs (Dejana, 2006).

#### **1.3.5.3.3. Quimiotaxis**

Una vez en los tejidos, el neutrófilo se mueve por quimiotaxis (migración dirigida), en la dirección del gradiente de concentración de quimioatrayente (Panés, 1999). Los neutrófilos exhiben múltiples receptores para quimioatrayentes que pueden activar la adhesión, migración celular directa y promover la desgranulación y las respuestas oxidativas. La unión de los quimioatrayentes a tales receptores activan fosfolipasas vía proteína G, resultando en la liberación de calcio intracelular, apertura de los canales de calcio y activación de PKC, lo cual está involucrado en las vías que conducen a desgranulación y activación de NADPH oxidasa (Witko y col., 2000).

#### **1.3.5.3.4. Fagocitosis**

Es el proceso por el cual células especializadas buscan, localizan, identifican e introducen a su citoplasma partículas o microorganismos extraños para destruirlos y digerirlos (Rojas, 2007).

Los microorganismos son reconocidos hasta que son recubiertos por opsoninas, las cuales se unen a receptores específicos situados en los leucocitos. En el neutrófilo, la fagocitosis involucra los receptores FcR que reconocen el fragmento de la inmunoglobulina provocando la extensión de protrusiones de membrana del neutrófilo sobre la partícula opsonizada para internalarla y los receptores del complemento que interaccionan con C3b y C3bi, donde la adhesión de partículas a los receptores CR1 y CR3 no es suficiente para promover la fagocitosis a menos que los neutrófilos sean activados por formilpéptidos (Witko y col., 2000).

Durante el englobamiento, el citoplasma emite pseudópodos los cuales rodean el microorganismo a ser fagocitado, resultando que el microorganismo quede en el interior de un fagosoma, lo cual activa vías de señalización y a la activación de la "explosión respiratoria" (Robbins, 1996).

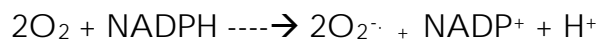
### 1.3.5.3.5. Muerte intracelular

El contacto del neutrófilo con el microorganismo inicia dos eventos involucrados en la muerte intracelular: la "explosión respiratoria" y la desgranulación leucocitaria.

#### 1.3.3.5.1. Explosión respiratoria

Desde el reconocimiento de la sustancia a fagocitar o del estímulo soluble, tanto neutrófilos como macrófagos experimentan una "explosión respiratoria", la cual consiste en un incremento de consumo de oxígeno, la generación de EOR (especies de oxígeno reactivas) seguida por la activación de un complejo NADPH oxidasa, que incluye anión superóxido y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), que en presencia de factores desencadenantes como MPO producen ácido hipocloroso (HOCl) el cual es un potente antioxidante que puede aumentar el daño tisular por parte del neutrófilo activado. De esta manera, los componentes de los gránulos lisosomales pueden potenciar la contribución en la generación de EOR (Ospina, 2000). Tanto el proceso de desgranulación como la formación de EORs se reconocen como frentes bactericidas que las células fagocíticas producen y aunque en principio esto es beneficio como mecanismo de defensa del hospedero, un desbalance en la producción de EORs puede generar un efecto deletéreo en los tejidos comprometidos en el foco inflamatorio y se produce así un daño tisular severo. Además de formar una variedad de EOR, el sistema NADPH oxidasa promueve la afluencia de cationes en el fagosoma, se cree que estos procesos permiten la actividad microbicida durante la fagocitosis (Oliveira y col., 2005).

Las EORs son moléculas que se encuentran en un estado más reactivo que el oxígeno molecular, en el cual, el oxígeno es reducido. El principal EOR es el anión superóxido el cual es formado por la reducción de un electrón del oxígeno molecular. En el neutrófilo esta reacción es catalizada por NADPH oxidasa:



El sistema NADPH oxidasa fue descubierto en neutrófilos en el cual presenta, tras la explosión respiratoria, la liberación de superóxido (Klebanoff, 2005).

### 1.3.5.3.5.2. Desgranulación Leucocitaria

Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en los tejidos deben ser atribuidos a la liberación del contenido de sus gránulos, en el fagolisosoma o en el medio extracelular. Los neutrófilos emplean péptidos antimicrobianos y proteínas, los cuales destruyen microorganismos invasores. Los neutrófilos poseen tres tipos de gránulos: los **gránulos primarios** o azurófilos que captan el colorante básico Azur A (de allí su nombre) que contienen Mieloperoxidasa (MPO), Elastasa, Betaglucuronidasa, Lisozima y otras enzimas hidrolíticas; los **gránulos secundarios** o específicos, que contienen Lisozima, Lactoferrina y Colagenasa juegan un papel importante en la fase inicial de la respuesta inflamatoria (Schettler y col., 1991; Muid y col., 1994) y los **gránulos terciarios** o de gelatinasa, contienen colagenasa y glicoproteínas que participan en la adherencia celular (Erzsébet y Mocsai, 1999).

La capacidad de inhibir la desgranulación leucocitaria podría ser un mecanismo de acción interesante de nuevos productos antiinflamatorios. Así, para estudiar la actividad de nuestros productos a este nivel empleamos el sistema inductor Citocalasina B / N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP). El factor quimiotáctico fMLP induce la desgranulación del neutrófilo de forma Citocalasina B dependiente, a través de un receptor específico situado en la membrana celular y que está acoplado a proteína G. Como indicadores del proceso de desgranulación leucocitaria se tiene en cuenta la determinación de los niveles de las enzimas MPO y elastasa, las cuales están mayoritariamente presentes en los gránulos azurófilos (Ospina, 2000).

Las proteasas derivadas del neutrófilo tienen la habilidad para degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, por esto juegan un papel importante en procesos fisiológicos. Se pueden identificar cuatro tipos de proteasa: serina proteasa, metaloproteasa, tiolproteasa y aspartato proteasas (Witko y col., 2000).

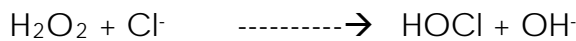
El papel esencial de la **Mieloperoxidasa (MPO)** es actuar como componente de la respuesta inmune innata a la invasión. La MPO es una hemoproteína que se almacena en los gránulos azurófilos primarios principalmente de los neutrófilos PMNs representando el 5% de la proteína total y es una de las proteínas más abundantes de estas células; también se ha encontrado en los monocitos (~1% de la proteína total) y en los macrófagos tisulares (Daugherty y col., 1994).

Durante la activación y desgranulación celular, la MPO es liberada tanto en vacuolas fagocíticas como directamente al espacio

extracelular. La MPO es sintetizada como un precursor durante la diferenciación mieloide en la médula ósea y su proceso se completa antes de que los PMNs se incorporen a la circulación. Los monocitos pierden gradualmente la MPO durante su maduración a macrófagos (Lau y Baldus, 2006). Es bien conocido y aceptado que el nivel de actividad de la MPO está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo que la medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio y también es considerada como un indicativo de estrés oxidativo (Moutaery, 2005; Cheng y col., 2006; Koksel y col., 2006).

Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno, generado tras la activación del neutrófilo, para oxidar los iones  $\text{Cl}^-$  presentes en el medio y dar lugar al ácido hipocloroso  $\text{HOCl}$ , un potente agente oxidante al cual se le atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo.

MPO



Entre las especies de oxígeno reactivas producidas por el neutrófilo se considera al ácido hipocloroso como el oxidante más reactivo; ya que es capaz de dañar estructuras proteicas y de reaccionar con los ácidos grasos insaturados originando la desestabilización de las membranas celulares (Ospina, 2000).

La **Elastasa** es una metaloproteína con actividad enzimática proteasa, es capaz de degradar el colágeno y los proteoglicanos del cartilago, la elastina (de allí su nombre) y la membrana basal. Además, puede convertir el fibrinógeno en fibrina y actuar sobre el complemento a distintos niveles (Muid y col., 1994). La elastasa está presente dentro de las placas arterioscleróticas y contribuye a los procesos de degradación de la matriz y el debilitamiento de la pared del vaso responsable de las complicaciones de la formación de aneurismas y la ruptura de placas. Es una proteasa con una amplia gama de sustratos y existe la posibilidad de un rápido incremento en la actividad elastasa asociada a la infiltración y desgranulación de neutrófilos en los síndromes coronarios agudos (Henriksen y Sallenave, 2008). El potencial antimicrobial de esta enzima parece estar relacionado con la actividad proteolítica de péptidos antimicrobianos sintetizados como proformas, tales como defensinas y catelicidina (Rodríguez y Vergel, 2004).

Estudios en animales han indicado el potencial de los inhibidores de elastasa en el tratamiento de la arterosclerosis, una enfermedad

inflamatoria crónica de los vasos sanguíneos arteriales, al establecer más fundamento y hallar el camino para estudios clínicos, lo que lo hace una diana terapéutica interesante (Henriksen y Sallenave., 2008). Además, esta enzima se encuentra implicada en patologías pulmonares como enfisema, bronquitis crónica y fibrosis quística (Witko y col., 2000).

La **Betaglucuronidasa** es una enzima que hidroliza el enlace glicosídico entre el ácido glucurónico y otras moléculas de compuestos endógenos y exógenos en organismos vivos. La enzima ha sido encontrada en animales, microorganismos y plantas, y su caracterización y rol es sujeto de estudios intensivos cubriendo un amplio rango de disciplinas en biología experimental (Jefferson, 1989). En mamíferos, la glucuronidación es el mayor proceso de detoxificación por el cual metabolitos son excretados eficientemente por el organismo, al no ser hidrolizados por enzimas intestinales: por desacoplamiento de glucurónidos en el intestino. Betaglucuronidasa desconjuga toxinas potenciales, incrementando la formación de carcinogénesis y promoviendo recirculación enterohepática de compuestos tóxicos (Fior y col., 2008). La Betaglucuronidasa puede aumentar el riesgo de cáncer porque los carcinógenos potenciales tienen la habilidad de recircular y actuar recíprocamente con las células (Maruti y col., 2008).

La Betaglucuronidasa se encuentra en la mayoría de los tejidos, tal como el hígado, riñón, bazo, el epitelio intestinal y los órganos endocrinos y reproductores (Maruti y col., 2008).

La **Lisozima** se encuentra presente en los gránulos primarios o azurófilos y secundarios o específicos. Es una enzima antibacteriana con capacidad de atacar carbohidratos de la pared celular de bacterias grampositivas por mecanismos enzimáticos al romper el lazo de unión entre el ácido murámico y el acetil glucosamida, presentes en la membrana celular de éstas. Es una enzima presente en varios líquidos como lágrimas y mucus nasal donde actúa como una barrera frente a las infecciones, también está presente en el bazo, los pulmones, los leucocitos, el plasma, la leche y el cartílago (Rojas y col., 2007). También se ha reportado e imputado a la Lisozima la hidrólisis de los enlaces N-acetilglucosamina en la quitina que forma la pared celular de hongos y algunos protozoos. También hay una creciente evidencia de que Lisozima elimina a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas por medios no enzimáticos. La actividad de la lisozima se ha detectado en los líquidos corporales y los tejidos de los moluscos (Itoh y col., 2007).

#### **1.3.5.3.6. Apoptosis**

La fase de resolución se cumple por la interacción entre macrófagos y fibroblastos y busca reparar los daños causados por la agresión. Generalmente, la inflamación aguda termina en resolución por apoptosis de las células participantes y por fagocitosis y lisis del microorganismo responsable, cuando el proceso es de origen infeccioso. Si el antígeno no es eliminado o fallan mecanismos homeostáticos, el proceso se hace crónico y se acompaña de daño tisular (Rojas y col., 2007)

Existen variables que pueden modificar el proceso de resolución de la inflamación como la naturaleza e intensidad de la lesión, la zona y tejidos afectados y el tipo de respuesta del huésped.

La apoptosis se conoce como muerte celular programada. La apoptosis de los neutrófilos y su posterior ingestión por los macrófagos es el mecanismo principal por el cual el organismo elimina células normales innecesarias o que han cumplido su función o su ciclo de vida (Maruti y col., 2008).

#### **1.4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON LA ACTIVIDAD DEL NEUTRÓFILO**

El neutrófilo es muy importante por su papel de defensa ante una invasión microbiana. Sin embargo, ante una respuesta no específica pueden lesionar el tejido normal pasando a contribuir con el daño tisular (Carrel y Lomas, 2002).

La alta incidencia de infecciones bacterianas que presentan los pacientes neutropénicos evidencian la importancia del neutrófilo, la neutropenia es una enfermedad autosómica recesiva, donde el recuento absoluto de polimorfonucleares (PMNs) desciende un 25% en 24 horas (Gonçalves y Appelberg, 2000). Hereditariamente existen defectos que afectan la estructura de los gránulos de neutrófilos: uno es la deficiencia específica del gránulo, es un desorden en el que se presentan infecciones bacterianas severas debido a la poca actividad bactericida. El otro defecto hereditario es el síndrome de Chediak-Higashi, donde se presenta un incremento de enfermedades infecciosas, debido a se ve alterada la actividad microbicida de los PMNs (Robbins y col., 1996).

El tratamiento de diferentes tipos de cáncer genera agranulocitosis, donde se presenta la carencia de PMNs, lo cual conduce a graves



infecciones, lo que podría causar la muerte si no existe tratamiento administrando factores estimuladores de la formación de colonias o transfusión de leucocitos (Rojas y col., 2007).

El exceso de actividad de la MPO produce un daño en el tejido, por ello su inhibición es un importante blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. En la literatura, aparecen reportados productos de origen natural como el ácido gálico (Kroes, 1999) y zanhasaponinas de *Zanha africana* (Cuellar y col., 1997) las cuales son capaces de inhibir la actividad de la MPO, lo cual es importante pues el exceso de actividad de la enzima produce daño tisular exagerado (Rodríguez y Vergel, 2004).

El exceso de elastasa está relacionado con enfermedades respiratorias como EPOC, fibrosis quística y enfisema pulmonar, entre otras. Por lo tanto, es un posible blanco terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas (Johansson y col., 2002). La elastasa está presente dentro de las placas arterioscleróticas y contribuye a los procesos de degradación de la matriz y el debilitamiento de la pared del vaso responsable de las complicaciones de la formación de aneurismas (Henriksen y Sallenave, 2008). La literatura reporta inhibidores de la elastasa como  $\alpha$ -1-antitripsina (Johansson y col., 2002; Henriksen y Sallenave, 2008).

La Betaglucuronidasa desconjuga toxinas potenciales, incrementando la formación de carcinogénesis y promoviendo recirculación enterohepática de compuestos tóxicos (Fior y col., 2008). Puede aumentar el riesgo de cáncer, porque los carcinógenos potenciales tienen la habilidad de recircular y actuar recíprocamente con las células (Maruti y col., 2008). La literatura reporta al Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno) aislado de la raíz de *Reunoutria japonica* (Kimura y col., 1994) como inhibidor de Betaglucuronidasa.

## **2. Capítulo 2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

El proceso inflamatorio es un proceso complejo de interacciones, por lo cual es necesario establecer una metodología *in vitro* que permita dilucidar los posibles mecanismos de acción en los cuales una sustancia, en este caso de origen vegetal, puede presentar actividad antiinflamatoria.

## **2.1. Reclutamiento de PMNs Humanos**

Se utilizó sangre periférica humana "buffy coat" (proporcionada por la Cruz Roja Colombiana), que es la fracción de una muestra de sangre no coagulada después de centrifugación que contiene la mayoría de los glóbulos blancos y de las plaquetas.

La metodología empleada permite evaluar *in vitro* la estimulación y liberación enzimática, obteniendo sobrenadantes ricos en productos derivados del proceso de activación y desgranulación celular que sufren los Leucocitos PMNs estimulados con Citocalasina B + fMLP.

## **2.2. Viabilidad celular**

### **2.2.1. Técnica de Azul de Tripán**

El ensayo de azul de Tripán es uno de los métodos más eficaces y usados para determinar viabilidad celular. Este tipo de tinción pertenece a las denominadas tinciones de exclusión (CYTED, 2002).

Las células con integridad funcional o anatómica de la membrana celular excluyen este colorante, por el contrario, las células muertas se tiñen de azul. Contando células muertas se establece el porcentaje de células vivas (CYTED, 2002).

## **2.3. Citotoxicidad**

Como paso inicial en muchos tipos de screening farmacológico es requisito previo conocer el potencial citotóxico de los compuestos objeto de estudio, bien porque van a ser empleados como fármacos, cosméticos o aditivos de alimentos y debe demostrarse que no son tóxicos (Freshney, 2000).

La definición de efecto tóxico varía, dependiendo de la naturaleza del estudio que se realiza y del punto final. Los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia. Los ensayos de viabilidad se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento se mantienen intactas. Mediante estos ensayos se evalúan concentraciones letales (CL) (Freshney, 2000).

Los ensayos de supervivencia evalúan la retención de la capacidad de proliferación después de un tratamiento; involucran un periodo de

recuperación después de retirar el tratamiento para observar si el daño causado por el mismo fue o no letal. Mediante estos ensayos se evalúan concentraciones inhibitorias de crecimiento (CI) (Freshney, 2000).

Varios métodos de fácil aplicación se basan en la exclusión ó incorporación de colorantes por parte de las células, lo que reflejará inicialmente la funcionalidad de la membrana en presencia de xenobióticos. Empleamos el método **reducción del MTT** (metil tiazol tetrazolio) el cual indica no solamente una buena funcionalidad de la membrana celular sino una capacidad metabolizadora adecuada (Ospina, 2000) y el método fluorométrico de **reducción de Resazurina**.

El porcentaje de viabilidad se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Abs Tratamiento} - \text{Abs Blanco Tratamiento}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

### 2.3.1. Ensayo del MTT (metil tiazol tetrazolio)

Este método fue desarrollado para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de células de mamíferos, resaltando entre sus ventajas precisión y rapidez (Mosmann, 1983).

El MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) es una sal tetrazolio de color amarillo y soluble en agua. En las células vivas el anillo tetrazolio se rompe por acción de las deshidrogenasas mitocondriales formando cristales de formazán de color azul violeta, insolubles en agua, pero solubles en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración celular es directamente proporcional a la producción de formazán, que se determina espectrofotométricamente leyendo la adsorbancia entre 540-570 nm y emplea como medida indirecta del número de células viables presentes (Mosmann, 1983).

### 2.3.2. Ensayo de Resazurina

El método de reducción de la resazurina fue recientemente introducido como un indicador de viabilidad celular no tóxica que puede ser utilizado para monitorear la proliferación celular y citotoxicidad. El método es descrito como un indicador de oxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como bacterias (Rasmussen, 1999).

La resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resofurina (rosado altamente fluorescente) por oxidorreductasas que se encuentran en la mitocondria de las células viables, así la medida de fluorescencia es un indicador de la función mitocondrial de las células. La resofurina se difunde al medio por lo cual es poco tóxica para las células y permite el monitoreo continuo de células humanas, animales, bacterias e incluso hongos (Rolón y col., 2005).

Es posible cuantificar colorimétricamente la resazurina no metabolizada que absorbe a una longitud de onda de 570 nm y fluorométricamente la resofurina con 530 nm de excitación y 590 nm de emisión. La medición fluorométrica es la más empleada por ser la más sensible y altamente reproducible (Hamid y col., 2004).

La resazurina es el colorante contenido en el producto comercial Alamar Blue®, incluido en numerosos kits para determinación de viabilidad celular.

## **2.4. Actividad Enzimática**

### **2.4.1. Actividad Mieloperoxidasa (MPO)**

La técnica empleada para evaluar la actividad MPO consiste en incubar los sobrenadantes que contienen MPO (neutrófilos estimulados con citocalasina B y fMLP) junto con el producto a evaluar, tampón fosfato y peróxido de hidrógeno. La MPO reduce al peróxido de hidrógeno y el oxígeno liberado se combina con tetrametilbencidina (TMB) que actúa como trazador de la reacción enzimática ya que este se oxida generando un compuesto de color azul turquesa, de tal forma que la intensidad del color es proporcional a la actividad de MPO que es determinada por fotometría a 620 nm, los valores de absorbancia son proporcionales a la magnitud de la reacción de MPO sobre su sustrato el peróxido de hidrógeno (Rodríguez y Vergel, 2004).

### **2.4.2. Actividad Elastasa**

El método empleado para determinar la actividad elastasa se basa en la obtención de un sobrenadante rico en esta enzima a partir de

leucocitos estimulados (CYTED, 1995). Se realiza una determinación colorimétrica del compuesto coloreado como el p-nitrofenol (414 nm) resultante de la acción de la elastasa, sobre el sustrato N-terbutoxicarboxialanina-p-nitrofeniléster (T-BOC), el cual al ser escindido por la enzima produce color amarillo (Ospina, 2000). Los compuestos inhibidores de la actividad de elastasa son interesantes para evitar las lesiones tisulares en procesos inflamatorios pulmonares donde se conoce está implicada la enzima (CYTED, 1995).

#### **2.4.3. Actividad Lisozima**

Este método se basa en la disminución de la turbidez de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* por acción de la enzima. La densidad óptica a 450 nm disminuye de forma proporcional el aumento de la concentración de Lisozima (Ferrándiz y Bustos, 1993).

#### **2.4.4. Actividad Betaglucuronidasa**

El método utilizado para su determinación se basa en la liberación de fenoltaleína por acción de Betaglucuronidasa, donde el color generado es proporcional a la cantidad de fenoltaleína liberada. Se determina la absorbancia a 540 nm (Ferrándiz y Bustos, 1993; Kimura y col., 1995; Kopprasch, 1998; He y col., 2010).

#### **2.4.5. Desgranulación Leucocitaria**

La liberación de enzimas es un indicador de la actividad de los neutrófilos al igual que la quimiotaxis, la generación de radicales libres del oxígeno y la fagocitosis entre otros. La capacidad de inhibir la desgranulación leucocitaria podría ser un mecanismo de acción de nuevos productos antiinflamatorios. Para estudiar la actividad de los productos a este nivel se emplea el inductor Citocalasina B y el agente quimiotáctico N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) que convierte al neutrófilo de célula fagocítica a célula secretoria (CYTED, 1995; Anderson y col., 2000).

El fMLP es un péptido sintético perteneciente a una amplia familia de compuestos con estructuras relacionadas, siendo el más activo en la inducción de la activación de PMNs. El fMLP activa a los neutrófilos a

través de la unión a receptores. Estudios previos han demostrado que la acción del fMLP como estimulante es a través de la activación de los receptores de membrana acoplados a proteína G. Existe una relación directa entre activación de la migración y liberación de enzimas producida por este agente. La Citocalasina B aumenta varias veces la liberación de enzimas inducida por fMLP. Parece ser que la desgranulación requiere que los neutrófilos presenten una superficie adecuada, lo cual es facilitado por la Citocalasina B (Ferrándiz y Bustos, 1993).

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos siguieron un diseño aleatorio y con mínimo 5 réplicas en cada uno. Los resultados fueron expresados como media aritmética de los valores  $\pm$  desviación estándar de la media. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de las pruebas de Chauvenet para rechazo de datos, "t" de Student para comparación de medias, y análisis de varianza simple (ANOVA) seguido de análisis de comparaciones múltiples (Test de Dunnett) con un nivel de significancia  $p < 5\%$ .

## 3. Capítulo 3. ESPECIES VEGETALES

Las especies vegetales se seleccionaron por su empleo etnofarmacológico en procesos inflamatorios en la población Colombiana. Para el presente trabajo se seleccionaron compuestos presentes en las especies *Salvia rubescens* y *Critoniella acuminata*.

### 3.1. *Critoniella acuminata* (H.B.K) R.M. King & H. Robinson

Clasificación Taxonómica:

**División:** Fanerógamas  
**Subdivisión:** Angiospermas  
**Clase:** Dicotiledóneas  
**Familia:** Asteracea  
**Género:** *Critoniella*  
**Especie:** *Critoniella acuminata*

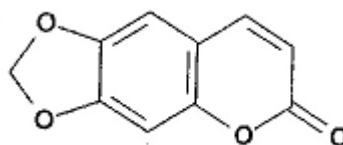
Es una planta distribuida en climas templados. En Colombia esta planta se encuentra abundantemente en los departamentos de Antioquia,

Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Santander y Valle (1320 a 2180 m.s.n.m). Muchas plantas de esta familia poseen lactonas sesquiterpénicas que causan dermatitis por contacto en los humanos. La investigación fitoquímica ha permitido determinar la presencia de compuestos químicos con actividad antitumoral y antibacteriana en algunas especies (García-Barriga, 1974).

*Critoniella acuminata* (H.B.K) R.M. King & H. Robinson es conocida popularmente como: santamaría, gerillo, quebrantadera, patinegra y trébol aromatizador. Las hojas se emplean popularmente en la curación de eczemas y otras enfermedades de la piel, para el tratamiento del cáncer, como antiinflamatorio, carminativo y desinfectante (Medina y col., 2007).

De *Critoniella acuminata* fueron aislados previamente Carbinol, dos derivados de Farnesen ( $C_{15}H_{24}$ ) y una cumarina (Ayapina) (Medina y col., 2007), en la cual ha sido evaluada su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular en ratón inducido por aceite de croton, por el grupo de investigación de Productos Naturales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, obteniéndose excelentes resultados en actividad antiinflamatoria (González y Vesga, 2003).

### 3.1.1. Ayapina



**Figura 3-1. Estructura de Ayapina**

6,7-metilendioxycumarina; 6H-1,3-dioxolo[4,5][1]benzopiran-2-ona

Peso molecular: 190.9 g/mol

Fórmula molecular:  $C_{10}H_6O_4$

Soluble en solución NaOH 10%, DMSO a 37°C e insoluble en agua, acetona, etanol y metanol.

Aislada de las partes aéreas, es un polvo de color amarillo-verdoso muy claro en el estudio realizado por Valenzuela (2007) en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

En un estudio realizado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, se encontró que ayapina presentó inhibición de la inflamación en el modelo de pleuresía (Valenzuela, 2007).

### 3.2. *Salvia rubescens*



Tomado de [www.aiapagoeta.com/index.php?&Sec=03&Sub=15](http://www.aiapagoeta.com/index.php?&Sec=03&Sub=15)

Clasificación Taxonómica:

**División:** Fanerógamas  
**Subdivisión:** Angiospermas  
**Clase:** Dicotiledóneas  
**Familia:** Labiatae  
**Género:** *Salvia*  
**Especie:** *Salvia rubescens*

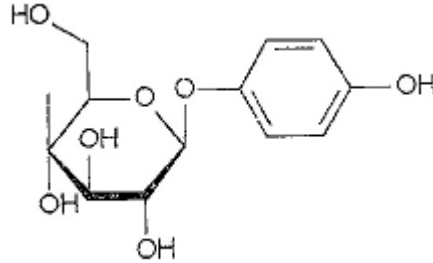
Esta planta se encuentra distribuida en muchas regiones del mundo, especialmente en el trópico. En Colombia esta planta crece en la zona central de la cordillera oriental de los Andes. Muchas especies de este género han sido usadas como plantas medicinales por la población colombiana para el tratamiento de infecciones microbianas, hepatitis viral, enfermedades cardíacas, desórdenes menstruales, hemorragias y otras anormalidades sanguíneas. Estudios fitoquímicos de varias especies de *Salvia* han conducido al aislamiento de flavonoides, diterpenos, triterpenos pentacíclicos y neoclerodanos, los cuales presentan actividad antioxidante, antitumoral y antimicrobial (Rodríguez y Vergel, 2004).

Previamente en un estudio realizado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia: "Efecto Antiinflamatorio y Antioxidante de Algunas Plantas Utilizadas en la Medicina Popular Colombiana", se encontró que el extracto total de *Salvia rubescens* logró inhibir mejor el edema en oreja de ratón que el fármaco utilizado como referencia (Velásquez., 2002). Por ello, se ha tenido un gran interés



por evaluar esta planta y dos de sus compuestos presentes: amarisolide y arbutina; y así, ampliar su perfil de actividad farmacológica.

### Arbutina

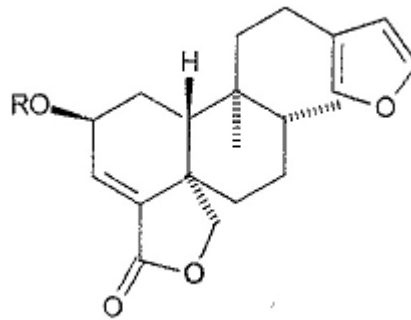


**Figura 3-2. Estructura de la arbutina**  
Hidroquinona-O-β-D-glucopiranosido

Peso molecular: 272,25 g/mol  
Formula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>

La actividad farmacológica de la arbutina radica en que es un potente inhibidor de radical hidroxilo, lo que podría contribuir a su efecto antiinflamatorio. Se usa como agente despigmentador en la industria cosmética y otras afecciones de la piel (Nihei y Kubo, 2003).

### Amarisolide



**Figura 3-3. Estructura del amarisolide**

2-β-O-β-D glucopiranosil-neoclerosa-3, 13(16), 14-trien-15, 16-epoxi-18, 19-ólido

Peso molecular: 330,42 g/mol  
Fórmula molecular: C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>  
Polvo blanco-amarillo pardo  
Amargo  
Soluble en metanol, DMSO e insoluble en agua.

El amarisolide es un glucósido diterpénico derivado del neoclerodano, es decir una estructura no muy común entre las especies de salvia (por

la glicosidación) y porque dicha configuración le confiere características interesantes en relación al perfil antiinflamatorio, sustentado por algunos reportes sobre moléculas similares (Hanson, 1998; Valenzuela, 2007). El screening preliminar mostró que esta molécula poseía una moderada actividad microbicida y una excelente actividad antiinflamatoria evaluada en el modelo de edema auricular inducido por TPA (Rodríguez y Vergel, 2004).

Se obtuvo a partir del extracto etanólico total de hojas y tallos en el estudio realizado por Valenzuela (2007) en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y en este mismo estudio se encontró que amarisolide presenta inhibición de la inflamación en el modelo de pleuresía por carragenina.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio farmacológico de plantas medicinales colombianas mediante el estudio *in vitro* de algunos mediadores de la inflamación.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Proponer ensayos de laboratorio que permitan realizar un screening *in vitro* para seleccionar compuestos con potencial antiinflamatorio.
- Implementar la determinación de actividad de enzimas correlacionadas con el proceso de desgranulación leucocitaria, por ejemplo Lisozima y Betaglucuronidasa.
- Evaluar los compuestos Ayapina, presente en *Critoniella acuminata*, y Arbutina y Amarisolide presentes en *Salvia rubescens*, en ensayos de desgranulación leucocitaria.

## 5. Capítulo 5. METODOLOGÍA

A continuación se presentan los reactivos y materiales que fueron empleados en el estudio y un breve fundamento de las técnicas seleccionadas.

### 5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

#### 5.1.1. Reactivos Biológicos

- PMNs humanos obtenidos de sangre periférica humana (Buffy Coat) proporcionada por la Cruz Roja Colombiana.

#### 5.1.2. Reactivos Químicos

- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Boc-Ala-O-phNO<sub>2</sub> (T-BOC) – SIGMA
- Citocalasina B – SIGMA
- Dextrano – SIGMA
- Ficoll - Hypaque™ Plus – AMERSHAM BIOSC.
- Glucurónido de fenolftaleína – SIGMA
- Lisozima – MERCK
- *Micrococcus lysodeikticus* - SIGMA
- MTT – SIGMA
- Indometacina – SIGMA
- Peróxido de hidrógeno – MERCK
- Reactivo Bradford
- TMB – SIGMA

### 5.1.3. Solventes

- DMF – ICN Biomedicals Inc.
- DMSO – SIGMA
- Etanol 96%

### 1.4. Equipos

- Balanza analítica– SARTORIUS
- Baño serológico – MEMMERT
- Cámara de Neubauer
- Centrífuga – Jouan
- Congelador – REVCO
- Espectrofotómetro – SPECTRONIC 20 GENESYS
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Incubadora – MEMMERT
- Lector de ELISA – BIORAD 550
- Micropipeta 2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  – Labmate
- Microscopio – OLYMPUS
- Espectrofluorómetro - TECAN GENios
- Vórtex - IKA

### 5.1.5. Soluciones

- Buffer acetato pH 4,5
- Buffer Dulbecco
- Buffer HBSS pH 7.4
- Buffer PBS pH 7.4
- Buffer fosfato pH 5.4
- Dextrano al 2% en suero fisiológico

- Solución de Turk

## **5.2. RECLUTAMIENTO DE LEUCOCITOS PMNs**

Los neutrófilos (Leucocitos Polimorfonucleares; PMNs) son la primera línea de defensa entre todos los elementos celulares implicados en la reacción inflamatoria frente al ataque por microorganismos a los cuales fagocitan, destruyen y digieren. También son capaces de destruir células tisulares y organismos mayores convenientemente opsonizados (Ospina, 2000). A continuación se describe el proceso de obtención y purificación de estas células.

### **5.2.1. Obtención de leucocitos PMNs humanos**

Los Leucocitos Polimorfonucleares se obtuvieron a partir de sangre humana (Buffy Coat) de donantes sanos, proporcionada por la Cruz Roja Colombiana.

Se Partió de 35 mL de sangre (Buffy Coat) a los que añadimos el mismo volumen de PBS pH 7.4, se disponen 30 mL de sangre diluida cuidadosamente sobre 10 mL de Ficoll-Hypaque en relación 3:1 evitando mezclar las fases. Con esto se obtiene el gradiente de densidad adecuado que tiene como fin separar células mononucleares de polimorfonucleares. Después de centrifugar por 40 minutos en una centrifuga con ángulo móvil (marca Jouan) a temperatura ambiente; en este punto se obtienen tres fases, se descarta la fase superior (plasma) y la interfase (mononucleares). El pellet que contiene PMNs y eritrocitos se diluye al doble con Buffer PBS pH 7,4 y se mezcla con un volumen igual de dextrano al 2% en solución salina 0,9%, invirtiendo el tubo de forma repetida para homogenizar la mezcla con el fin de separar eritrocitos y PMNs. Se dejó en reposo por 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se toma la fase superior de dextrano donde se encuentran suspendidos los leucocitos y se centrifuga a 325xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se descarta el sobrenadante y el pellet obtenido se sometió a lisis hipotónica con 10 mL de solución salina fría (4°C mínimo) al 0,2% y transcurridos unos segundos añadimos 10 mL de solución salina al 1,6% para restablecer tonicidad de la suspensión celular.

Nuevamente centrifugamos a las mismas condiciones anteriores y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet obtenido en PBS con Glucosa 10 mM, realizamos recuento celular y determinamos viabilidad celular (Rioja y col., 2000; Ospina, 2000; Rodríguez y Vergel., 2004).

**Tabla 5-2. Protocolo experimental para la obtención de PMNs humanos**

35 mL de sangre humana de donantes sanos (Buffy coat)
Adicionar PBS pH 7,4 al doble
Disponer 30 mL de sangre diluida sobre 10 mL de Ficoll-Hypaque
Centrifugar 1400 rpm por 40 min a T ambiente
Eliminar fase superior e interfase y diluir el pellet al doble con PBS
Adicionar dextrano al 2% en proporción 1:1 y mezclar invirtiendo tubo
Dejar en reposo por 40 minutos y centrifugar la fase superior por 15 min
Resuspender pellet en 10 mL de solución salina fría 0.2%
Adicionar 10 mL de solución salina 1,6%
Centrifugar por 15 min a T ambiente
Resuspender el pellet en PBS con glucosa 10 mM
Realizar recuento celular y establecer viabilidad

#### 5.2.1.1. Recuento celular

A 10 µL de suspensión de leucocitos se añadieron 190 µL de solución de Turk, la cual lisa eritrocitos contaminantes y le da mayor nitidez a los núcleos de los neutrófilos, y se agitó durante 2 minutos. Se llenó la cámara de Neubauer y se contó en el microscopio las células presentes en los cuatro cuadrantes (Rodríguez y Vergel, 2004).

El número de células por mL está dado por la expresión:

$$\text{Cél/mL} = X \text{ cuadrantes} * (1 * 10^4) * F$$

F: factor de dilución

X: promedio de células presentes en 4 cuadrantes

### 5.2.1.2. Viabilidad celular por la Técnica de Azul de Tripán

Las células con integridad funcional o anatómica de la membrana celular excluyen este colorante. Por lo tanto el porcentaje de supervivencia se calculó por conteo del número de células teñidas en función del total de células.

A 100 µL de la suspensión celular se añaden 100 µL de azul de tripán al 0,2%. Luego de 10 minutos se hace recuento en cámara de Neubauer de las células vivas (no teñidas) y de células totales (CYTED, 2002). El porcentaje de viabilidad está dado por:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{células no teñidas} / \text{células totales}) * 100$$

## 5.3. CITOTOXICIDAD

### 5.3.1. Ensayo del MTT (metil tiazol tetrazolio)

Este método fue desarrollado para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de células de mamíferos, resaltando entre sus ventajas precisión y rapidez (Mosmann, 1983).

#### Protocolo experimental

Los PMNs han de ser preincubados con el producto a evaluar durante 30 minutos a 37°C, luego de este tiempo se centrifuga por 10 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante por aspiración con cuidado de no desprender las células adheridas a la microplaca. Se adiciona una solución de MTT (0,42 mg/mL), se incuba durante 1 hora y 30 minutos a 37°C, nuevamente se centrifuga por 10 minutos, se elimina el sobrenadante, se añaden 100 µL de DMSO y se agita por 5 minutos en un Vórtex. Se determina la absorbancia a 492 nm, donde el grupo Control se considera como equivalente al 100% de viabilidad o 0% de letalidad. La magnitud de la absorbancia en el grupo Problema se expresa como porcentaje respecto al grupo Control (Ospina, 2000; Valenzuela, 2007).

El porcentaje de viabilidad se calculó así:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \times 100$$



**Tabla 5-3. Protocolo para la determinación de citotoxicidad por MTT**

Reactivos (Ci)	Blanco (µl)	Control (µl)	Problema (µl)
Producto a evaluar (10 mM)	—	—	5
DMSO	—	5	—
PMNs 5x10 <sup>6</sup> cél/mL	-----	200	200
Incubar 30 min a 37°C			
Centrifugar 1850xg 10 min a 4°C			
Eliminar sobrenadante			
MTT 0,42 mg/mL	—	100	100
Incubar 1 hora y media a 37°C			
Centrifugar 1850xg 10 min a T ambiente			
Eliminar sobrenadante			
DMSO	100	100	100
Agitar microplaca en un vórtex por 5 min			
Leer Absorbancia a 492 nm			

Ensayo por triplicado

### 5.3.2. Ensayo de Resazurina

El método de reducción de la resazurina fue recientemente introducido como un indicador de viabilidad celular no tóxica que puede ser utilizado para monitorear la proliferación celular y citotoxicidad. El método es descrito como un indicador de óxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como de bacterias (Rasmussen, 1999).

#### Protocolo experimental

Los PMNs han de ser preincubados con el producto a evaluar durante 30 minutos a 37°C, luego de este tiempo se centrifuga por 10 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante por aspiración con cuidado de no desprender las células adheridas a la microplaca. Se realiza lavado con Buffer PBS pH 7,4 y se retira PBS por aspiración. Se incuba durante 12 horas a 37°C, se añaden 50 µL de Resazurina, se incuba durante 4 horas a 37°C y se agita en Vórtex por 5 minutos. Se realiza la lectura en fluorómetro para placas a 530 nm<sub>exc</sub> y 590 nm<sub>em</sub>, donde el grupo Control se considera como equivalente al 100% de viabilidad o 0% de

letalidad. La magnitud de la absorbancia en el grupo Problema se expresa como porcentaje respecto al grupo Control (Hamid y col., 2004).

**Tabla 5-4. Protocolo para la determinación de citotoxicidad por Resazurina**

Reactivos (Ci)	Blanco ( $\mu$ l)	Control ( $\mu$ l)	Problema ( $\mu$ l)
Producto (10 mM)	—	—	5
PMNs $5 \times 10^6$ cél/mL	—	200	200
Incubar por 30 minutos a 37°C			
Buffer PBS pH 7.4	200	—	—
Retirar PBS por aspiración			
Incubar por 12 horas a 37°C			
Resazurina 0.44 $\mu$ M	50	50	50
Incubar 4 horas a 37°C			
Agitar por 5 min			
Leer Fluorescencia a 530 nm <sub>exc</sub> y 590 nm <sub>em</sub>			

Ensayo por triplicado

#### 5.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LEUCOCITARIA

Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de los Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs) en los tejidos deben ser atribuidos a la liberación del contenido de sus gránulos. Los neutrófilos poseen dos tipos de gránulos: los primarios o azurófilos que contienen Mieloperoxidasa (MPO), Elastasa, Betaglucuronidasa, Lisozima y otras enzimas hidrolíticas y los secundarios o específicos, que contienen lisozima, lactoferrina y colagenasa (Schettler y col., 1991; Muid y col., 1994).

Se evaluó el efecto de los compuestos en estudio sobre la actividad directa enzimática; es decir, si los compuestos inhiben directamente cada una de las enzimas a evaluar (MPO, Elastasa, Lisozima y Betaglucuronidasa), y se evaluó el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria; es decir, si los compuestos inhiben el proceso de desgranulación leucocitaria de cada enzima.

#### 5.4.1. Obtención de fuente de enzimas neutrofílicas

La liberación de enzimas es un indicador de la actividad de los neutrófilos al igual que la quimiotaxis, la generación de radicales libres del oxígeno y la fagocitosis (Ferrándiz y Bustos, 1993).

Para obtener la fuente enzimática se realizó el siguiente procedimiento: Se incuban 10 mL de una suspensión celular de PMNs ( $10^7$  cél/mL) con 5  $\mu$ L del preinductor Citocalasina B (Cf: 10  $\mu$ M) durante 5 minutos a 37°C. Los leucocitos se estimulan adicionando 5  $\mu$ L de fMLP (Cf: 10 nM) e incubando nuevamente durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, la suspensión se centrifuga a 1850xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido es almacenado hasta la determinación de mediadores (Anderson y col., 2000; CYTED, 2002; Rodríguez y Vergel, 2004).

**Tabla 5-5. Protocolo para la obtención de fuente enzimática**

Disponer de suspensión celular de PMNs 10 mL / $10^7$ cél/mL
Adicionar Citocalasina B (Cf: 10 $\mu$ M)
Incubar 5 min / 37°C
Adicionar fMLP (Cf: 10 nM)
Incubar 10 min / 37°C
Centrifugar 1850 xg / 10 min / 4°C
Conservar el sobrenadante a -70°C

Ensayo por Triplicado

#### 5.4.2. Actividad Mieloperoxidasa (MPO).

##### 5.4.2.1. Evaluación actividad enzimática MPO.

A 50  $\mu$ L de sobrenadante que contiene MPO se adiciona 2,5  $\mu$ L del producto a evaluar en microplaca de 96 pozos. Se añade Buffer PBS pH 7,4 y peróxido de hidrogeno (Cf: 0.3 mM), se incuba durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se adiciona el sustrato TMB (Cf: 1.5 mM), se detiene la reacción con 30  $\mu$ L de acetato sódico pH 3.0 y se determina la absorbancia a 620 nm (Ospina, 2000; Rodríguez y Vergel, 2004).

**Tabla 5-6. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática MPO.**

Reactivos (Ci)	Blanco ( $\mu$ l)	Control ( $\mu$ l)	Problema ( $\mu$ l)
Sobrenadante	-----	50	50
HBSS pH 7.4	50	-----	-----
Producto (10 mM)	-----	-----	2,5
Vehículo	2,5	2,5	-----
Tampón PBS 7.4	100	100	100
Tampón Fosfato	50	50	50
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,012%)	20	20	20
Incubar 5 min a 37°C			
TMB 18 mM	20	20	20
Incubar 3 min a 37°C			
Acetato Sódico 1.5 M	30	30	30
Leer absorbancia a 620 nm			

Ensayo por Triplicado

#### **5.4.2.2. Evaluación del proceso de desgranulación Leucocitaria - actividad MPO.**

Se dispone de una suspensión de PMNs a la cual se le adiciona 5  $\mu$ L de los productos a evaluar (Cf: 100  $\mu$ M). Se adiciona 5  $\mu$ L de Citocalasina B (Cf: 10  $\mu$ M) y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Se agregan 5  $\mu$ L de fMLP (Cf: 10 nM), se incuba durante 10 minutos a 37°C y se centrifuga a 1850xg durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se toman 50  $\mu$ L del sobrenadante obtenido, se añade PBS pH 7.4, buffer fosfato pH 5.4, peróxido de hidrógeno (Cf: 0.3 mM) y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Finalmente, se adiciona el sustrato TMB (Cf: 1.5 mM), se incuba por 3 minutos a 37°C, se detiene la reacción con 30  $\mu$ L de buffer acetato sódico 1.5 M, pH 3.0 y se determina la absorbancia a 620 nm.

Tabla 5-7. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre el proceso de desgranulación leucocitaria – actividad MPO.

Reactivos	Blanco (µL)	Control (µL)	Blanco Problema (µL)	Problema (µL)
PMNs (2.5x10 <sup>6</sup> cél/mL)	500	500	500	500
Producto (10 mM)	-----	-----	5	5
Vehículo	5	5	-----	-----
Incubar 5 min a 37°C				
Citocalasina B (1mM)	-----	5	-----	5
Incubar 5 min a 37°C				
fMLP (1 µM)	-----	5	-----	5
Incubar 10 min a 37°C				
Centrifugar 1850xg por 10 min a 4°C				
Sobrenadante	50	50	50	50
Tampón PBS pH 7.4	100	100	100	100
Tampón fosfato pH 5.4	50	50	50	50
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.012 %)	20	20	20	20
Incubar 5 min a 37°C				
TMB (18 mM)	20	20	20	20
Incubar 3 min a 37°C				
Acetato Sódico 1.5 M pH 3.0	30	30	30	30
Determinar absorbancia a 620 nm				

Ensayo por Triplicado

### 5.4.3. Actividad Elastasa.

#### 5.4.3.1. Evaluación actividad enzimática directa Elastasa.

A 250 µL de la fuente enzimática se añaden 2,5 µL de los compuestos a evaluar (Cf: 100 µM) en placa de 96 pozos. Se añade el sustrato Boc-Ala-OPhNO<sub>2</sub> y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Finalmente, se determina la absorbancia a 410 nm (Rioja y col., 2000).

**Tabla 5-8. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática Elastasa.**

Reactivo	Blanco (µL)	Control (µL)	Problema (µL)
Sobrenadante	-----	50	50
PBS pH 7.4	250	200	200
Producto (10 µM)	-----	-----	2.5
Vehículo	2.5	2.5	-----
Boc-Ala-OphNO <sub>2</sub> (100 µM)	5	5	5
Incubar 10 min a 37°C			
Determinar absorbancia a 410 nm			

Ensayo por Triplicado

#### 5.4.3.2. Evaluación del proceso de desgranulación leucocitaria - actividad elastasa.

Una suspensión celular de PMNs ( $2.5 \times 10^6$  cél/mL) se incuban 5 minutos a 37°C junto con 5 µL de los productos a evaluar (Cf: 100 µM). Posteriormente, se añaden 5 µL de Citocalasina B (Cf: 10 µM) y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Se determina la absorbancia a 410 nm (Rodríguez y Vergel, 2004).

**Tabla 5-9. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre el proceso de desgranulación leucocitaria - actividad elastasa.**

Reactivos	Blanco (µL)	Control (µL)	Blanco Problema (µL)	Problema (µL)
PMNs ( $2.5 \times 10^6$ cél/mL)	500	500	500	500
Producto (10 µM)	-----	-----	5	5
Vehículo	5	5	-----	-----
Incubar 5 min a 37°C				
Citocalasina B (1mM)	-----	5	-----	5
Incubar 5 min a 37°C				
fMLP (1µM)	-----	5	-----	5
Incubar 10 min a 37°C				
Centrifugar 1850xg por 10 min a 4°C				
Sobrenadante	250	250	250	250
Boc-Ala-OphNO <sub>2</sub> (100 µM)	5	5	5	5
Incubar 20 min a 37°C				
Determinar absorbancia a 410 nm				

Ensayo por Triplicado

#### 5.4.4. Actividad Lisozima.

Los protocolos descritos a continuación para determinar del efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática lisozima y sobre la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima, fueron ajustados e implementados con base al protocolo para determinación de radical peroxilo (Payá y col, 1992; Halliwell, 1995) utilizado en el Departamento de Farmacia. En el capítulo de resultados y discusión se comentan las variables ajustadas.

##### 5.4.4.1. Evaluación actividad enzimática Lisozima.

A 300 µL de fuente enzimática junto con 10 µL de los productos a evaluar en tubo de ensayo, se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 700 µL de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (0,6 mg/mL) en Buffer Dulbecco y se midió la disminución de turbidez a 450 nm en espectrofotómetro UV-Visible durante 30 segundos. Se compararon los resultados con un estándar de lisozima pura.

El porcentaje de inhibición de la liberación de Lisozima en la fuente enzimática obtenida se calculó así:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta \text{Abs Lisozima Fuente} - \Delta \text{Abs Problema}}{\Delta \text{Abs Lisozima Fuente}} \times 100$$

El porcentaje de inhibición de la liberación de Lisozima Pura se calculó así:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta \text{Abs Lisozima Pura} - \Delta \text{Abs Problema}}{\Delta \text{Abs Lisozima Pura}} \times 100$$

**Tabla 5-10. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática Lisozima.**

Reactivo (Ci)	Control Lisozima (µL)	Blanco Fuente (µL)	Blanco Problema (µL)	Lisozima Problema (µL)	Problema (µL)
Sobrenadante	-----	300	300	-----	300
Lisozima 10.000 U/mL	300	-----	-----	300	-----
Producto (10 mM)	-----	-----	-----	10	10
Incubar por 15 min a 37°C					
Vehículo	-----	-----	10	-----	-----
Micrococcus (0,6 mg/mL)	700	700	700	700	700
Determinar absorbancia a 450 nm					

Ensayo por Triplicado

#### **5.4.4.2. Evaluación proceso de desgranulación leucocitaria - actividad lisozima.**

Se preincubaron durante 15 minutos a 37°C 300 µL una suspensión de PMNs (2,5x10<sup>6</sup> cél/mL) con 10 µL de los productos a evaluar (Cf: 100 µM). Tras la adición de 5 µL de Citocalasina B (Cf: 10 µM) se incubó durante 3 minutos a 37°C y se agregaron 5 µL de fMLP (Cf: 10 nM) para estimular la liberación de enzimas neutrofílicas y se incubó nuevamente durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionó 700 µL de *Micrococcus lysodeikticus* (0,6 mg/mL) en Buffer Dulbecco y se determinó la disminución de turbidez a 450 nm durante 30 segundos. Se compararon los resultados con un estándar de Lisozima pura (MERCK).

El porcentaje de inhibición de la liberación de Lisozima en la fuente enzimática obtenida se calculó así:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\Delta \text{Abs Lisozima Fuente} - \Delta \text{Abs Problema}}{\Delta \text{Abs Lisozima Fuente}} \times 100$$

El porcentaje de inhibición de la liberación de Lisozima Pura se calculó así:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\Delta \text{Abs Lisozima Pura} - \Delta \text{Abs Problema}}{\Delta \text{Abs Lisozima Pura}} \times 100$$



**Tabla 5-11. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre el proceso de desgranulación leucocitaria – actividad lisozima.**

Reactivo	Control Lisozima (µL)	Blanco Fuente (µL)	Blanco Problema (µL)	Problema (µL)
PMN (2,5x10 <sup>6</sup> cél/mL)	-----	300	300	300
Lisozima 10.000 U/mL	300	-----	-----	-----
Producto (10 mM)	-----	-----	-----	10
Vehículo	5	5	15	-----
Citocalasina B (1mM)	5	5	-----	5
Incubar por 3 min a 37°C				
fMLP (1 µM)	5	5	-----	5
Incubar por 5 min a 37°C				
Micrococcus (0,6 mg/mL)	700	700	700	700
Determinar absorbancia a 450 nm				

Ensayo por Triplicado

#### **5.4.5. Actividad Betaglucuronidasa**

Los protocolos descritos a continuación para determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática betaglucuronidasa y sobre la desgranulación leucocitaria – actividad betaglucuronidasa fueron ajustados e implementados con base a protocolos utilizados en la literatura (Ferrándiz y Bustos, 1993; Kimura y col., 1995; Kopprasch, 1998; He y col., 2010). En el capítulo de resultados y discusión se comentan las variables ajustadas.

##### **5.4.5.1. Evaluación actividad enzimática betaglucuronidasa.**

Para la determinación de Betaglucuronidasa en la obtención de la fuente enzimática se adicionan 10 µL de Tritón X-100 al 20% en HBSS, un surfactante no iónico usado como en algunos protocolos de tinción en la permeabilización de membranas, después de la Citocalasina B, lo demás se realiza igual al protocolo descrito para obtención de leucocitos PMNs.

A 60 µL de fuente enzimática junto con 5 µL de los productos a evaluar en microplaca de 96 pozos y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 35 µL de una solución de Glucurónido de fenolftaleína en Buffer acetato pH 5 y 80 µL de Buffer acetato sódico pH 5,2 y se incubó nuevamente durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se agregaron 70 µL de Buffer carbonato/ Bicarbonato pH 9,6 a 10,4 para detener la reacción y se determinó la absorbancia a 540 nm.

**Tabla 5-12. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática betaglucuronidasa.**

Reactivo	Blanco (µL)	Control (µL)	Problema (µL)
Sobrenadante	-----	100	100
Buffer HBSS pH 7.4	100	-----	-----
Producto (10 µM)	-----	-----	5
Vehículo	5	5	-----
Incubar 5 min a 37°C			
Glucurónido de Fenolftaleína (1 mM)	25	25	25
Buffer acetato sódico pH 5,2	50	50	50
Incubar por 30 min a 37°C			
Buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	75	75	75
Determinar absorbancia a 540 nm			

Ensayo por Triplicado

#### 5.4.5.2. Evaluación proceso de desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa.

Se preincubaron durante 5 minutos a 37°C 500 µL de una suspensión de PMNs ( $2,5 \times 10^6$  cél/mL). Tras la adición de 10 µL de Citocalasina B (Cf: 10 µM) y 10 µL de Tritón X-100 al 20% en Buffer HBSS se incubó durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 10 µL de fMLP (Cf: 10 nM), se incubó por 10 minutos a 37°C para estimular la liberación de enzimas neutrofilicas y se centrifugó a 1850xg durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100 µL del sobrenadante obtenido y se colocaron en microplaca de 96 pozos. Se añadió 25 µL una solución de Glucurónido de Fenolftaleína en Buffer acetato, 50 µL de Buffer acetato sódico pH 5,2 y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se agregaron 75

$\mu\text{L}$  de Buffer carbonato/ Bicarbonato pH 9,6 a 10,4 para detener la reacción y se determinó la absorbancia a 540 nm.

**Tabla 5-13. Protocolo para evaluar el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria – actividad betaglucuronidasa.**

Reactivos	Blanco ( $\mu\text{L}$ )	Control ( $\mu\text{L}$ )	Blanco Problema ( $\mu\text{L}$ )	Problema ( $\mu\text{L}$ )
PMNs ( $2.5 \times 10^6 \text{cél/mL}$ )	500	500	500	500
Producto (10 mM)	-----	-----	5	5
Vehículo	5	5	-----	-----
Incubar 5 min a 37°C				
Citocalasina B (1 mM)	-----	10	-----	10
Triton X-100 al 20% en HBSS	-----	10	-----	10
Incubar 5 min a 37°C				
fMLP (1 $\mu\text{M}$ )	-----	10	-----	10
Incubar 10 min a 37°C				
Centrifugar 1850xg por 10 min a 4°C				
Sobrenadante	100	100	100	100
Glucurónico de Fenolftaleína (1 mM)	25	25	25	25
Buffer acetato sódico pH 5,2	50	50	50	50
Incubar 20 min a 37°C				
Buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	75	75	75	75
Determinar absorbancia a 540 nm				

Ensayo por Triplicado

## 6. Capítulo 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue contribuir al estudio farmacológico de principios activos de plantas medicinales colombianas con potencial antiinflamatorio como: ayapina, aislada de *Critoniella acuminata* en un estudio realizado por Valenzuela (2007); amarisolide, aislada de *Salvia rubescens* en un estudio realizado por Valenzuela (2007) y arbutina (SIGMA) presente en *Salvia rubescens*; mediante el estudio *in vitro* de enzimas correlacionadas con el proceso de desgranulación leucocitaria (MPO, Elastasa, Lisozima y Betaglucuronidasa); que permitiera evaluar el potencial efecto inhibitorio directo sobre la enzima o sobre la inhibición de la desgranulación de los PMNs. De esta forma, contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de estos compuestos.

### 6.1. RECLUTAMIENTO DE PMNs

Para realizar los estudios *in vitro*, es necesario encontrar una fuente neutrofílica con densidad celular, viabilidad y especificidad adecuadas.

Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre humana (buffy coat) de donantes sanos, proporcionada por la Cruz Roja Colombiana.

#### 6.1.1. PMNs Humanos

Al realizar el recuento y la viabilidad celular se obtuvieron los siguientes resultados:

Rendimiento:  $2,8 \times 10^6$  neutrófilos / mL de sangre total

Viabilidad: mayor al 95%.

### 6.2. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD

Se realizó el estudio de citotoxicidad de los productos, con el fin de comprobar y verificar el comportamiento citotóxico de estos frente a PMNs humanos.

### 6.2.1. Ensayos del MTT y Resazurina

Para el ensayo por MTT, de acuerdo a datos reportados por Rodríguez y Vergel (2004), la concentración adecuada para evaluar citotoxicidad sobre PMNs y cumplir con la ley de Lambert y Beer se encuentra entre 3 y 9 millones de cél/mL (se evaluaron 5 millones de cél/mL). La longitud de onda de máxima absorción para el formazán se encuentra en 506 nm, se trabajó con el filtro de 490 nm por ser el más cercano disponible.

El porcentaje de viabilidad se calcula así:

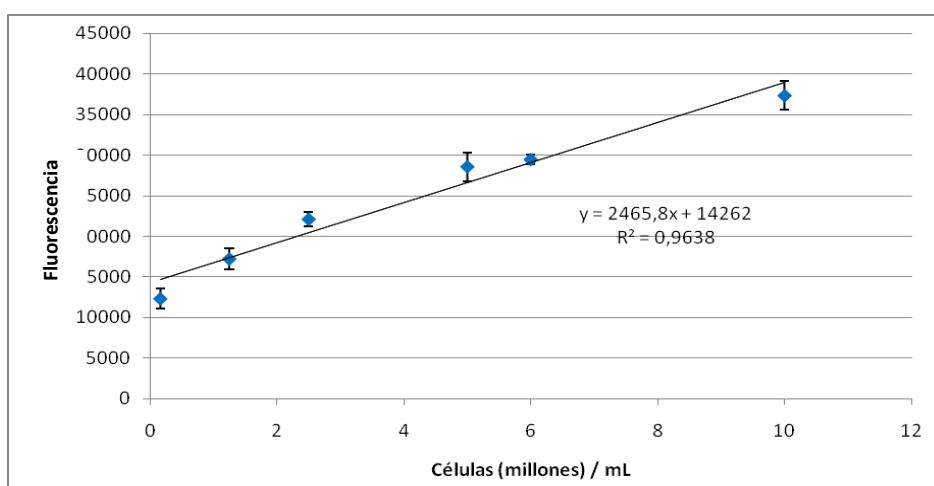
$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Control: células solas

Tratamiento: células tratadas con compuestos

Para el ensayo por Resazurina también se usaron PMNs humanos y se determinó la concentración adecuada realizando una curva de calibración Absorbancia vs. cél/ mL. Según los resultados obtenidos en la gráfica No.3 y de acuerdo a criterios de linealidad decidimos evaluar 5 millones de cél/mL.

**Gráfica 6-3. Curva de calibración para la determinación de la concentración de Resazurina para PMNs.**

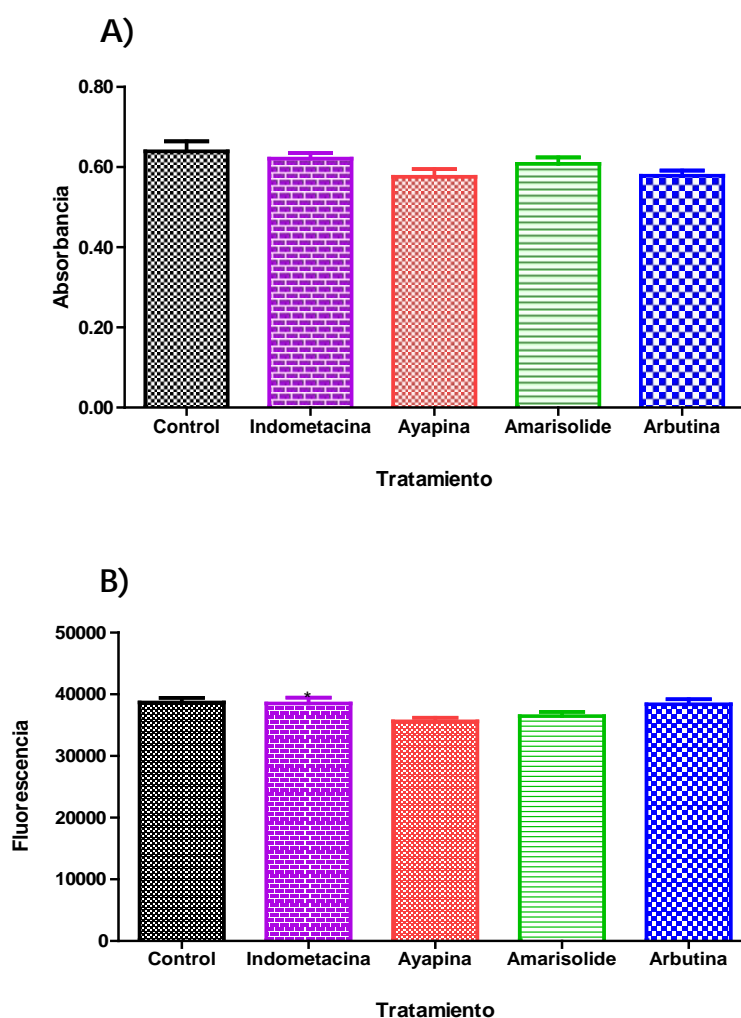


Según la literatura (Hamid y col., 2004), es posible cuantificar colorimétricamente la resazurina no metabolizada que absorbe a una longitud de onda de 570 nm y fluorométricamente la resofurina con 530 nm de excitación y 590 nm de emisión. Los ensayos realizados se

realizaron fluorométricamente, ya que es un método más empleado por ser el más sensible y altamente reproducible.

Para los dos métodos empleados, la viabilidad se establece con respecto a un control de DMSO (vehículo) al cual se le asigna el 100% de viabilidad, de esta forma se halla la citotoxicidad correspondiente al compuesto evaluado y no a su vehículo.

Un compuesto se considera citotóxico cuando el porcentaje de viabilidad es inferior al 80% con un coeficiente de variación no mayor al 20% (Rodríguez y Vergel, 2004).



**Gráfica 6-4. Ensayo de Citotoxicidad.** Efecto de los compuestos sobre los PMNs humanos en ensayo por MTT (A) y ensayo por Resazurina (B). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por cada tratamiento, Concentración = 100  $\mu$ M). PMNs Humanos (5 x 10<sup>6</sup> cél/mL). Test de Dunnett \*p < 0,05 frente al control.

TRATAMIENTO	MTT		Resazurina	
	Absorbancia	Viabilidad (%)	Fluorescencia	Viabilidad (%)
Control	0,6393 ± 0,08	100	38653 ± 2295,3	0
Ayapina	0,5760 ± 0,06	90,1 ± 9,0	35598 ± 1754,5*	92,1 ± 4,5
Amarisolide	0,6081 ± 0,05	95,1 ± 7,6	36441 ± 2038	94,3 ± 5,3
Arbutina	0,5784 ± 0,04	90,5 ± 6,0	38370 ± 2418	99,3 ± 6,3
Indometacina	0,6213 ± 0,04	97,2 ± 6,6	38494 ± 2877	99,6 ± 7,4

**Tabla 6-14.** Viabilidad de PMNs en presencia de los compuestos en estudio. Cada barra es la media ± D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por cada tratamiento, Concentración = 100 µM). PMNs Humanos (5 x 10<sup>6</sup> cél/mL). Test de Dunnett \*p < 0,05 frente al control.

Como se puede observar en la gráfica 6-5 y tabla 6-14, se comprobó y verificó que en general el amarisolide y la arbutina no presentaron citotoxicidad significativa, ya que existe una viabilidad mayor al 90% a la concentración evaluada (100 µM). La ayapina a pesar de mostrar diferencia significativa en ensayo por Resazurina, nuestro criterio acepta que no hay citotoxicidad relevante. El ensayo fue realizado por triplicado no encontrándose diferencias significativas entre ensayos realizados.

### 6.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se evaluó el efecto de los compuestos en estudio sobre la actividad enzimática; es decir, si los compuestos inhiben directamente cada una de las enzimas a evaluar (MPO, Elastasa, Lisozima y Betaglucuronidasa), y también se evaluó el efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria; es decir, si los compuestos inhiben el proceso de desgranulación leucocitaria que libera a las enzimas.

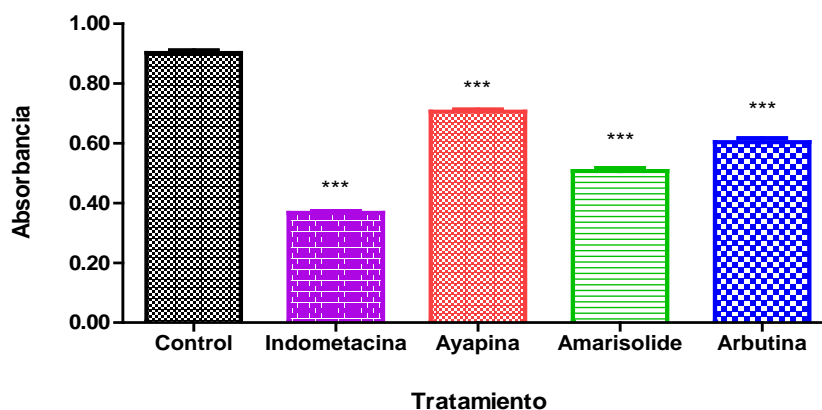
Consideramos un compuesto inhibidor de la actividad enzimática o del proceso de desgranulación leucocitaria cuando presenta valores por encima de 25% de inhibición y un coeficiente de variación no mayor al 20% en las condiciones empleadas.

#### 6.3.1. ACTIVIDAD MPO

##### 6.3.1.1. Inhibición enzimática de MPO

Los compuestos fueron evaluados a una concentración de 100 µM. El fármaco de referencia fue indometacina (100 µM). El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a un control que contiene la fuente

enzimática y el vehículo de los productos evaluados.



**Gráfica 6-5.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática MPO. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  MPO: 620 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (620 nm)	Inhibición (%)
Control	0,9020 $\pm$ 0,03	0
Ayapina	0,7056 $\pm$ 0,03***	21,9 $\pm$ 2,8
Amarisolide	0,5074 $\pm$ 0,03***	43,7 $\pm$ 3,7
Arbutina	0,6038 $\pm$ 0,05***	33,1 $\pm$ 5,1
Indometacina	0,3672 $\pm$ 0,02***	59,3 $\pm$ 2,5

**Tabla 6-15.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática MPO. Cada barra es la media  $\pm$  D.E., de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

La actividad MPO fue evaluada utilizando tetrametilbencidina (TMB). La MPO reduce al peróxido de hidrógeno y el oxígeno liberado se combina con TMB que actúa como trazador de la reacción enzimática ya que este se oxida generando un compuesto de color azul turquesa, dando una absorbancia proporcional a la actividad de MPO.

La Indometacina como fármaco de referencia inhibió la actividad MPO en un valor por encima del 50%, corroborando que es un potente inhibidor de MPO (Békési, 2005).

Ayapina no presentó una actividad inhibitoria, mientras que arbutina y amarisolide presentaron valores de inhibición por encima del 25%, esto sugiere que principalmente para estos compuestos parte de su efecto



antiinflamatorio se debe a la inhibición directa de la actividad enzimática MPO.

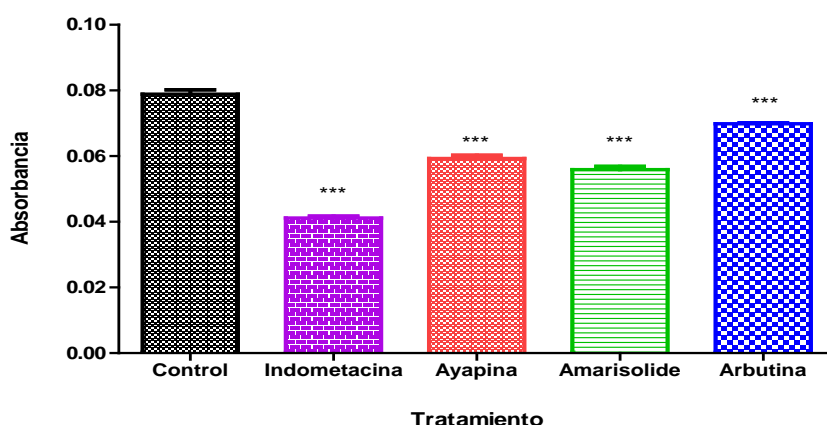
Los compuestos con actividad antiinflamatoria promisoriosa y en especial con un mecanismo de inhibición MPO como amarisolide y arbutina, son importantes debido a que el exceso de la enzima produce un daño en el tejido (Békési y col, 2005) y su inhibición es un importante blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. La literatura reporta inhibidores específicos de MPO como el ácido 4-aminobenzoico-hidracida/ABAH, donde MPO oxida al ABAH convirtiéndolo en un radical que reduce a la enzima (Mytar y col., 1999).

### 6.3.1.2. Inhibición de la desgranulación leucocitaria – actividad MPO.

Se utilizaron neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana (buffy coat) preincubados con compuestos a evaluar y estimulados con Citocalasina B (Cf: 10  $\mu$ M) y fMLP (Cf: 10 nM). Se determinaron los porcentajes de inhibición de la desgranulación. La Indometacina se usó como fármaco de referencia.

$$\% \text{ Inh. Liberación enzimática} = 100 - (100 \times \text{Abs. Tratamiento} / \text{Abs. Control})$$

En este ensayo se evaluó la actividad MPO la cual suministra información sobre la inhibición que presentan los compuestos empleados sobre la desgranulación leucocitaria. Una mayor absorbancia refleja una mayor actividad que se evidencia con el aumento de la coloración.



**Gráfica 6-6.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad enzimática MPO. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  MPO: 620 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs humanos  $2,5 \times 10^6$  cél/ml. Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (620 nm)	Inhibición (%)
Control	0,0788 ± 0,005	0
Ayapina	0,0593 ± 0,003***	24,5 ± 4,1
Amarisolide	0,0559 ± 0,003***	29,2 ± 4,4
Arbutina	0,0699 ± 0,001***	11,4 ± 1,3
Indometacina	0,0411 ± 0,002***	47,8 ± 2,7

**Tabla 6-16.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad enzimática MPO. Cada barra es la media ± D.E., de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100 µM). PMNs humanos 2,5 x 10<sup>6</sup> cél/ml. Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

Como observamos en la gráfica 6-6 y en la Tabla 6-16, arbutina y ayapina no presentan inhibición de la desgranulación leucocitaria, mientras que amarisolide presenta una inhibición moderada. La Indometacina (fármaco de referencia) presentó una inhibición cercana al 48%, lo cual indica que presenta actividad como inhibidor y es conveniente usarlo como control positivo.

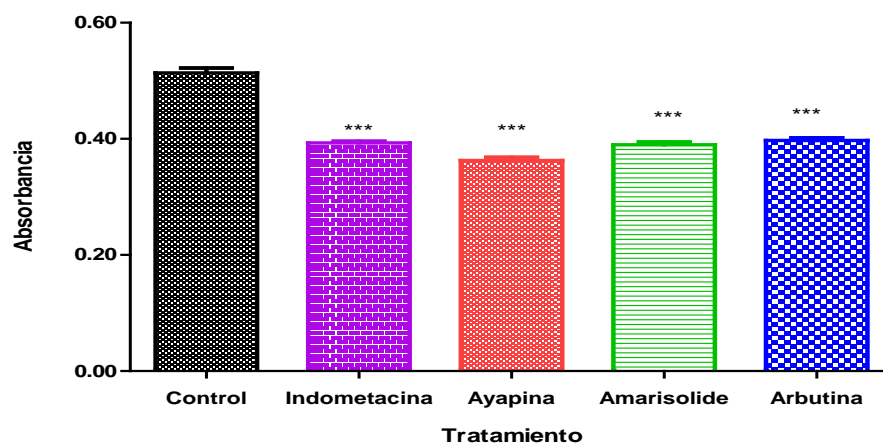
Se sugiere que, amarisolide, de *Salvia rubescens*, constituye un compuesto con actividad antiinflamatoria interesante ya que presenta inhibición tanto de la enzima como inhibición parcial del proceso de desgranulación, lo cual es importante ya que MPO representa un blanco terapéutico debido a que esta enzima se encuentra implicada en varias enfermedades inflamatorias crónicas.

En el caso de ayapina, no presenta inhibición de la enzima ni del proceso de desgranulación y arbutina presenta inhibición moderada de la enzima pero no del proceso de desgranulación. Además, se confirmó a indometacina como control positivo tanto de la inhibición de MPO como de su proceso de desgranulación, lo que concuerda con la literatura (Békési y col., 2005).

### 6.3.2. ACTIVIDAD ELASTASA.

#### 6.3.2.1. Inhibición enzimática de Elastasa.

Los resultados obtenidos mostraron que el fármaco de referencia (indometacina) presentó un porcentaje de inhibición bajo, no adecuado para utilizarse como control positivo. Ayapina presenta una inhibición moderada, mientras que amarisolide y arbutina no inhiben a elastasa.



**Gráfica 6-7.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática elastasa. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  Elastasa: 415 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (415 nm)	Inhibición (%)
Control	0,5136 $\pm$ 0,03	0
Ayapina	0,3628 $\pm$ 0,02***	29,0 $\pm$ 3,3
Amarisolide	0,3898 $\pm$ 0,02***	24,1 $\pm$ 3,3
Arbutina	0,3972 $\pm$ 0,02***	22,7 $\pm$ 3,0
Indometacina	0,3931 $\pm$ 0,01***	23,5 $\pm$ 2,0

**Tabla 6-17** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática elastasa. Cada barra es la media  $\pm$  D.E., de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

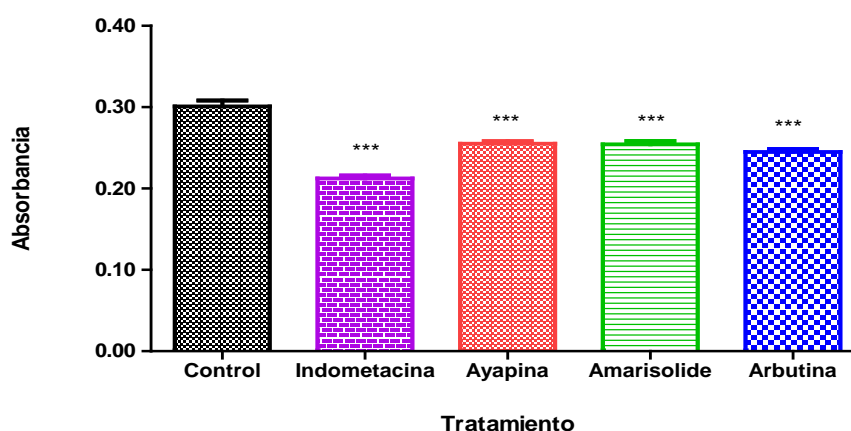
Los resultados sugieren que ayapina una metilendioxicumarina presenta un importante mecanismo de acción en la actividad antiinflamatoria inhibiendo moderadamente la elastasa. Las cumarinas en general presentan actividad antioxidante y algunas veces antiinflamatoria (Maes y col., 2005). La actividad de la enzima sugiere, que parte de su efecto antiinflamatorio demostrado *in vivo* (Valenzuela, 2007) se encuentra relacionado con la inhibición directa de la actividad elastasa, enzima que se encuentra implicada en enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis y la EPOC (Henriksen y Sallenave, 2008).

La literatura reporta inhibidores de elastasa como  $\alpha$ -1-antitripsina (11  $\mu$ g/mL) (Johansson y col., 2002) y el TEI-8362 ácido butanóico 4(N-(3-((3-carboxipropil)amino)-8-metil-1-oxo-4-zaisocromona-6-il)carbamoil)-4-((fenilmetoxil)carbonilamino)C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>, un compuesto sintético soluble

en agua probado *in vitro* que presentó inhibición selectiva de elastasa (CI<sub>50</sub>: 1.9 nM) y además inhibición significativa frente a modelos *in vivo* de elastasa-inducida mejorando daño pulmonar.

### 6.3.2.2. Inhibición de la desgranulación leucocitaria – actividad elastasa.

Como observamos en la gráfica 6-8 y en la tabla 6-18, ninguno de los compuestos evaluados presenta inhibición del proceso de desgranulación leucocitaria.



**Gráfica 6-8.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad enzimática elastasa. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  Elastasa: 415 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs humanos  $2,5 \times 10^6$  cél/ml. Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (415 nm)	Inhibición (%)
Control	0,3010 $\pm$ 0,02	0
Ayapina	0,2551 $\pm$ 0,01***	15,0 $\pm$ 3,4
Amarisolide	0,2544 $\pm$ 0,01***	15,5 $\pm$ 4,6
Arbutina	0,2450 $\pm$ 0,01***	18,6 $\pm$ 4,2
Indometacina	0,2123 $\pm$ 0,01***	29,5 $\pm$ 4,3

**Tabla 6-18.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad enzimática elastasa. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs humanos  $2,5 \times 10^6$  cél/ml. Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

Los resultados sugieren que sus mecanismos de acción podrían estar más relacionados con la inhibición de la actividad de otros mediadores inflamatorios u otras enzimas lisosomales. La indometacina presenta una

inhibición moderada por cual no lo consideramos un buen control positivo.

En conclusión, amarisolide y arbutina no presentan inhibición enzimática ni inhibición de la desgranulación leucocitaria. Ayapina presenta inhibición moderada de la enzima pero no del proceso de desgranulación, por lo cual sería conveniente profundizar en el estudio *in vivo* de este compuesto frente a enfermedades inflamatorias crónicas donde se encuentre implicada la elastasa. Además, se observa que indometacina no es un buen control positivo en determinación de la actividad elastasa.

### **6.3.3. ACTIVIDAD LISOZIMA.**

#### **6.3.3.1. Inhibición enzimática de Lisozima.**

En este ensayo se evaluó la actividad lisozima la cual suministra información de la inhibición que ejercen los compuestos directamente en la actividad enzimática.

Este método se basa en la disminución de la turbidez de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* por acción de la enzima, donde la absorbancia disminuye de forma proporcional al aumento de la concentración de la enzima. La inhibición de lisozima fue comparada con una solución estándar de lisozima pura (MERCK).

El protocolo descrito en la metodología para determinar actividad lisozima fue ajustado e implementado como mostramos a continuación:

#### **Implementación:**

Antes de la realización de las pruebas se tuvieron en cuenta algunas variables para la determinación de la actividad de la enzima:

- Se inició evaluando la Lisozima pura a una concentración de 100.000 U/mL, pero debido a que los resultados mostraban valores de  $\Delta$ Abs muy altos en comparación con los valores obtenidos de la fuente enzimática, disminuimos la concentración a 10.000 U/mL, obteniendo valores de  $\Delta$ Abs comparables con la fuente enzimática ( $\Delta$ Abs: 0,202) y de esta manera procedimos a realizar una comparación de los resultados obtenidos de inhibición enzimática directa por parte de los compuestos evaluadas con Lisozima pura y con fuente

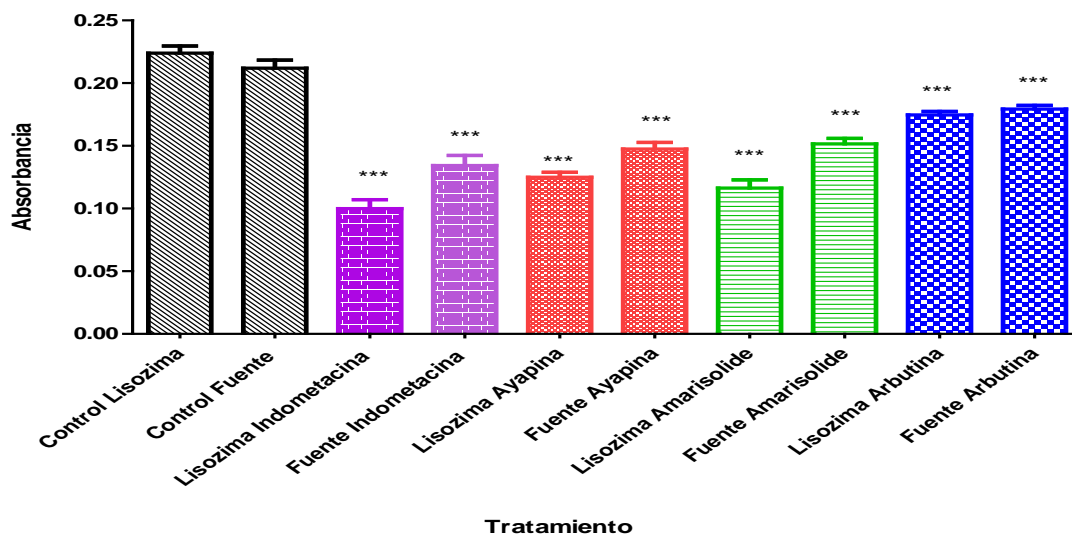
enzimática obtenida que contiene actividad Lisozima (Ver tabla 6-19).

CONCENTRACIÓN LISOZIMA (U/mL)	$\Delta A/\text{min}$ (450 nm)
100.000	0,923 $\pm$ 0,06
40.000	0,699 $\pm$ 0,06
30.000	0,565 $\pm$ 0,07
20.000	0,383 $\pm$ 0,05
10.000	0,198 $\pm$ 0,02

**Tabla 6-19.** Determinación de la actividad de lisozima pura. Resultados expresados como la MEDIA  $\pm$  DE (n= 4 determinaciones).

- Se evaluó la actividad lisozima utilizando los volúmenes descritos en el protocolo tanto de fuente enzimática que contiene actividad Lisozima, Lisozima pura y de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, debido a que en la literatura son las proporciones reportadas utilizadas (Ferrándiz y Bustos, 1993; Kopprash y col., 1997).
- Debido a que no se contaba con un inhibidor específico de Lisozima, se empleó como control positivo la indometacina, un reconocido antiinflamatorio e inhibidor de MPO.
- Para todos los compuestos evaluados se determinó la influencia del vehículo (DMSO) sobre la suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, descontando este valor como blanco y así determinamos la actividad de las sustancias pero no de su vehículo.
- Para todos los compuestos evaluados se determinó la actividad de la fuente enzimática y de lisozima pura sobre la suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, tomada como 100% de actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Gráfica 6-9.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática lisozima. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  Lisozima: 450 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E., de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

TRATAMIENTO	$\Delta A/\text{min}$ (450 nm)	% Inhibición	TRATAMIENTO	$\Delta A/\text{min}$ (450 nm)	% Inhibición
Control Fuente	0,2120 $\pm$ 0,02	0	Control Lisozima	0,2239 $\pm$ 0,02	0
Fuente-Ayapina	0,1475 $\pm$ 0,02***	29,5 $\pm$ 7,9	Lisozima-Ayapina	0,1249 $\pm$ 0,01***	44,3 $\pm$ 6,1
Fuente-Amarisolide	0,1515 $\pm$ 0,02***	28,5 $\pm$ 7,3	Lisozima-Amarisolide	0,1163 $\pm$ 0,02***	48,1 $\pm$ 10,3
Fuente-Arbutina	0,1793 $\pm$ 0,01***	15,4 $\pm$ 4,8	Lisozima-Arbutina	0,1747 $\pm$ 0,01***	22,0 $\pm$ 4,2
Fuente-Indometacina	0,1343 $\pm$ 0,03***	36,6 $\pm$ 13,1	Lisozima-Indometacina	0,0999 $\pm$ 0,03***	55,4 $\pm$ 11,2

**Tabla 6-20.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática lisozima. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos en la evaluación de los compuestos junto con la fuente enzimática y la Lisozima pura se observó que la Indometacina-fuente y la indometacina-lisozima presentan valores diferentes, lo cual probablemente se debe a que en la fuente enzimática encontramos otras enzimas como MPO, la cual podría ser inhibida preferentemente por la indometacina. Además, creemos que por esta misma razón los valores de inhibición de lisozima pura en presencia de los compuestos son mayores que los valores obtenidos con la fuente enzimática que contiene actividad lisozima.

Los resultados obtenidos sugieren que parte del modo de acción de ayapina y amarisolide se encuentra relacionado con la inhibición de lisozima.

En conclusión, se confirma a indometacina como control positivo y amarisolide y ayapina muestran alta inhibición de lisozima pura. Igualmente, la inhibición de lisozima presentada en la fuente enzimática de estos dos compuestos es promisoria. Esto muestra claramente que al encontrarse la lisozima pura es fácilmente inhibida por los compuestos evaluados, pero que al determinar la actividad de los compuestos en fuente enzimática que contiene otras enzimas como MPO, elastasa y otras, los compuestos inhiben preferentemente las otras enzimas lo que explicaría los bajos porcentajes de inhibición.

Es escasa la información sobre agentes inhibidores de lisozima. No encontramos referencias de productos naturales vegetales con esta actividad. Se encuentran reportados inhibidores aislados de *E. Coli* (Callewaert y col., 2005) y glicósidos sintéticos de tri y tetrasacaridos (Zurabyan y col., 1971). También se reportan otros agentes como agentes oxidantes, alcoholes, SDS y n-acetil-D-glucosamina (página web Worthington Bichemical corporation: lysozyme-consultada Diciembre 2010).

#### **6.3.3.2. Inhibición de la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima.**

El protocolo descrito en la metodología para determinar la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima, fue ajustado e implementado como mostramos a continuación:

##### **Implementación:**

Antes de la realización de las pruebas se tuvieron en cuenta algunas variables para la determinación de la desgranulación leucocitaria:

- Se evaluó la desgranulación leucocitaria utilizando diferentes volúmenes tanto de PMNs ( $2,5 \times 10^6$  cél/mL) como de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, obteniendo mejores resultados con las proporciones descritas en el protocolo, debido a que en la literatura son las proporciones reportadas utilizadas (Ferrándiz y Bustos, 1993; Kopprash y col., 1997).
- Dado que no se contaba con un inhibidor específico de la desgranulación leucocitaria – actividad lisozima, se empleó como control positivo la indometacina, un reconocido antiinflamatorio e inhibidor de MPO.



- Para todos los compuestos evaluados se determinó la influencia del vehículo (DMSO) sobre la suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, descontado este valor como blanco y poder así determinar la actividad de las sustancias mas no de su vehículo.
- Para todos los compuestos evaluados se determinó la actividad de la fuente enzimática y lisozima pura sobre la suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*, tomada como 100% de actividad de la enzima.
- Cuantificamos la potencia de la lisozima en la fuente enzimática, según los datos obtenidos de  $\Delta$ Abs de 10.000 U/mL de lisozima pura. Los resultados obtenidos nos mostraron que la fuente enzimática obtenida presentaba una potencia de 10.645 U/mL.

Concentración lisozima pura: 10.000 U/mL

$\Delta$ Abs lisozima pura: 0,2945

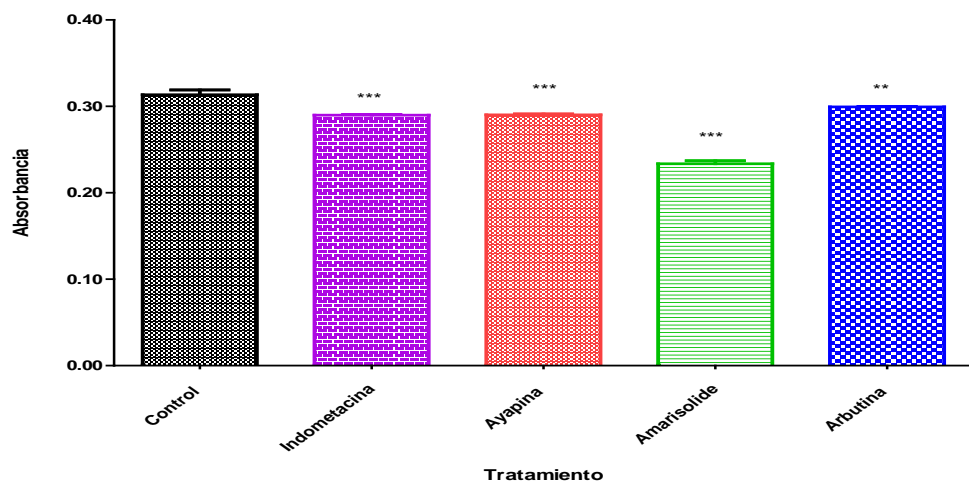
Concentración lisozima en la fuente enzimática: ?

$\Delta$ Abs fuente: 0,3135

$$\text{Conc. Lisozima fuente} = \frac{\text{Conc. Lisozima pura} \times \Delta\text{Abs fuente}}{\Delta\text{Abs lisozima pura}}$$

Conc. Lisozima fuente = 10.645 U/mL

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



Gráfica 6-10. Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria -

actividad enzimática lisozima. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  Lisozima: 450 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs  $2,5 \times 10^6$  cél/mL. Test de Dunnett, \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

TRATAMIENTO	$\Delta A/\text{min}$ (450 nm)	Inhibición (%)
Control Lisozima	$0,2945 \pm 0,03$	0
Control Fuente	$0,3135 \pm 0,02$	0
Ayapina	$0,2903 \pm 0,003^{***}$	$7,4 \pm 1,1$
Amarisolide	$0,2335 \pm 0,012^{***}$	$25,5 \pm 3,8$
Arbutina	$0,2993 \pm 0,002^{***}$	$4,5 \pm 0,7$
Indometacina	$0,2899 \pm 0,003^{***}$	$7,5 \pm 0,9$

**Tabla 6-21.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad enzimática lisozima. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs  $2,5 \times 10^6$  cél/mL. Test de Dunnett, \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

Según los datos de la gráfica 6-10 y tabla 6-21, observamos que amarisolide es el único compuesto que presenta inhibición de la desgranulación. Es decir que, los demás compuestos inhiben la lisozima pero no el proceso de desgranulación leucocitaria que la libera. Además, vemos que la indometacina no es un buen control positivo para este ensayo pues los resultados de inhibición son muy bajos.

### 6.3.4. ACTIVIDAD BETAGLUCURONIDASA.

#### 6.3.4.1. Inhibición enzimática de betaglucuronidasa.

El método utilizado para su determinación se basa en la liberación de fenoltaleína por acción de betaglucuronidasa, donde el color generado es proporcional a la cantidad de fenoltaleína liberada. Se determina la absorbancia a 540 nm (Ferrándiz y Bustos, 1993; Kimura y col., 1995; Kopprasch, 1998; He y col., 2010).

El protocolo descrito en la metodología para determinar la actividad betaglucuronidasa, fue ajustado e implementado como mostramos a continuación:

#### Implementación:

Antes de la realización de las pruebas se tuvieron en cuenta algunas variables para la determinación de la actividad betaglucuronidasa:

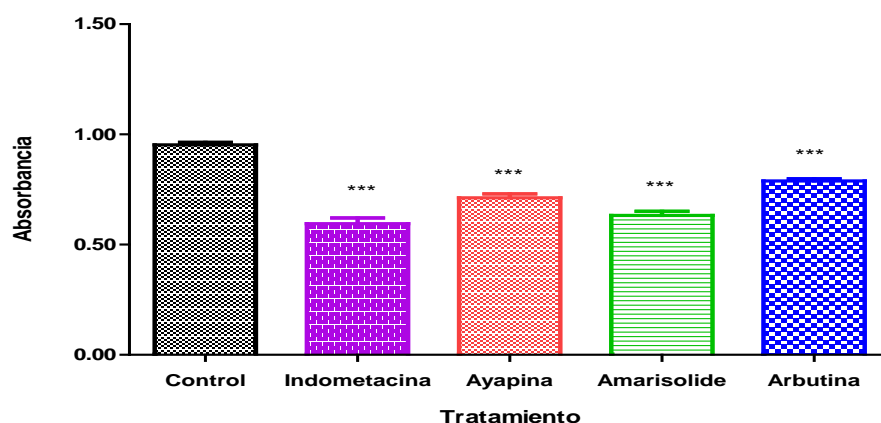
- La concentración de glucurónido de fenolftaleína usada fue 1 mM, debido a que se encontraban valores cercanos reportados en la literatura (Kimura y col., 1995; Kopprasch, 1998; He y col., 2010).
- Se evaluó la inhibición enzimática utilizando diferentes volúmenes tanto de fuente enzimática como de sustrato (glucurónido de fenolftaleína 1 mM), obteniendo mejores resultados con las proporciones descritas en el protocolo. Como observamos en la tabla, al variar las cantidades de sobrenadante o glucurónido de fenolftaleína el pico de mayor color o actividad de la enzima se encuentra en la proporción 100:30, por lo que esta fue utilizada finalmente.

Sobrenadante (μL)	Glucurónido de fenolftaleína (μL)	Absorbancia (540 nm)
20	100	0,26472 ± 0,02
60	60	0,56192 ± 0,03
80	40	0,87384 ± 0,02
100	30	0,9484 ± 0,03
110	20	0,82692 ± 0,03
120	10	0,7458 ± 0,03

**Tabla 6-22.** Determinación de volúmenes para evaluar actividad betaglucuronidasa. Concentración glucurónido de fenolftaleína: 1 mM. Resultados expresados como la MEDIA ± D.E. (n= 4 determinaciones).

- Dado que no se contaba con un inhibidor específico de la Betaglucuronidasa, se empleó como control positivo la indometacina, un reconocido antiinflamatorio e inhibidor de MPO.
- Para todos los compuestos evaluados se determinó la influencia del vehículo (DMSO), descontado este valor como blanco y así determinar la actividad de las sustancias pero no de su vehículo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Gráfica 6-10.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática betaglucuronidasa. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  betaglucuronidasa: 540 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M. Test de Dunnett, \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (540 nm)	Inhibición (%)
Control	0,9526 $\pm$ 0,04	0
Ayapina	0,7121 $\pm$ 0,06***	26,3 $\pm$ 5,2
Amarisolide	0,6327 $\pm$ 0,06***	33,6 $\pm$ 6,8
Arbutina	0,7890 $\pm$ 0,03***	17,2 $\pm$ 3,5
Indometacina	0,5949 $\pm$ 0,09***	37,5 $\pm$ 9,6

**Tabla 6-23.** Efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática betaglucuronidasa. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). Test de Dunnett, \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

Según los valores obtenidos, amarisolide y ayapina inhiben la betaglucuronidasa, mientras que arbutina por el contrario no presenta inhibición de la enzima, ya que valores por debajo de 25% no representan relevancia biológica. La inhibición de betaglucuronidasa es importante ya que su actividad incrementa la carcinogénesis y promueve la recirculación enterohepática de compuestos tóxicos (Fior y col., 2008). Además, esta enzima parece estar relacionada con enfermedades inflamatorias alérgicas como el asma (Kimura, 1995).

### 6.3.4.2. Inhibición de la desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa.

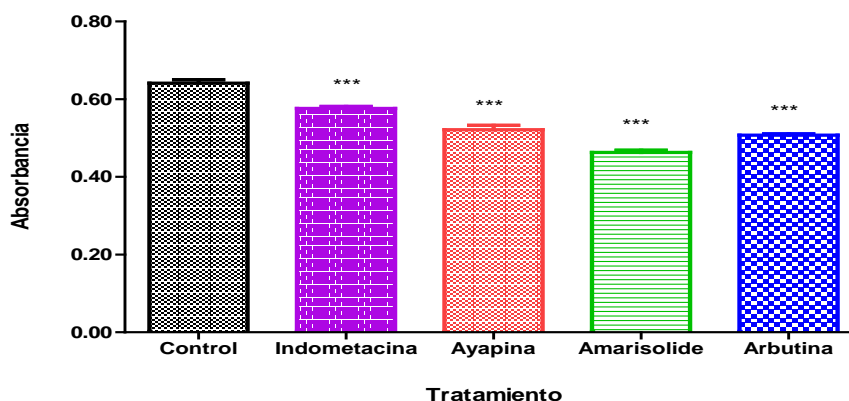
El protocolo descrito en la metodología para determinar la desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa, fue ajustado e implementado como mostramos a continuación:

#### Implementación:

Antes de la realización de las pruebas se tuvieron en cuenta algunas variables para la determinación de la desgranulación leucocitaria:

- La concentración de glucurónido de fenolftaleína usada fue 1 mM, debido a que se encontraba reportada en la literatura está concentración (Kimura y col., 1995; Kopprasch, 1998; He y col., 2010).
- Dado que no se contaba con un inhibidor específico de la desgranulación, se empleó como control positivo la indometacina, un reconocido antiinflamatorio e inhibidor de MPO.
- Para todos los compuestos evaluados se determinó la influencia del vehículo (DMSO) en la inhibición de la desgranulación, descontado este valor como blanco y así determinar la actividad de las sustancias más no de su vehículo.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Gráfica 6-12.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa. Promedio de absorbancias ( $\lambda$  betaglucuronidasa: 540 nm). Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100  $\mu$ M). PMNs  $2,5 \times 10^6$  cél/mL. Test de Dunnett, \*\*\* $p < 0,001$  frente al control.

TRATAMIENTO	Absorbancia (540 nm)	Inhibición (%)
Control	0,6412 ± 0,03	0
Ayapina	0,5216 ± 0,04***	18,3 ± 6,0
Amarisolide	0,4630 ± 0,02***	27,8 ± 2,9
Arbutina	0,5072 ± 0,01***	20,9 ± 1,8
Indometacina	0,5763 ± 0,02***	10,1 ± 2,8

**Tabla 6-24.** Efecto de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria - actividad betaglucuronidasa. Cada barra es la media ± D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento, Concentración: 100 µM). PMNs 2,5 x 10<sup>6</sup> cél/mL. Test de Dunnett, \*\*\*p < 0,001 frente al control.

Como observamos, amarisolide presenta inhibición de la desgranulación leucocitaria y de la actividad enzimática directa betaglucuronidasa. La indometacina con valores tan bajos de inhibición no es un buen control positivo. La literatura reporta algunas sustancias aisladas de plantas que inhiben la liberación de betaglucuronidasa como el Resveratrol (2,3,4',5-tetrahidroxistilbene-2-O-D-glucósido) a una concentración de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-7</sup> M (Kimura y col., 1994).

El Resveratrol se ha aislado de las raíces de *Reynoutria japonica* Houtt. (Poligonacea), una planta usada popularmente en la medicina tradicional japonesa para tratar la inflamación alérgica (Kimura y col., 1994).

De manera general, en sistemas de desgranulación de PMNs inducida por ionóforo de calcio se ha sugerido que el Resveratrol podría inhibir la liberación de enzimas lisosomales a través de la inhibición del sistema 5-lipoxigenasa en los neutrófilos. Se sabe que la inhibición de lipoxigenasa también bloquea la respuesta de la desgranulación (Kimura y col., 1994). En correlación con nuestros resultados, el compuesto amarisolide inhibe la desgranulación - actividad betaglucuronidasa con valores cercanos al 30% y en el estudio realizado por Valenzuela en 2007 se evaluó la respuesta lipoxigenasa a través de leucotrieno B4 que es un indicador de actividad 5-lipoxigenasa con valores de inhibición para amarisolide de 57%, confirmando la relación existente entre la inhibición de lipoxigenasa y el bloqueo de la desgranulación.

## 7. CONCLUSIONES

- Se ajustaron e implementaron técnicas *in vitro* para la determinación del efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática de lisozima y betaglucuronidasa, y sobre la desgranulación leucocitaria-actividad lisozima y betaglucuronidasa.
- Ningún compuesto evaluado presenta citotoxicidad en las condiciones experimentales trabajadas.
- Amarisolide, en las condiciones evaluadas, presenta inhibición en forma directa de las actividades enzimáticas MPO.
- Amarisolide inhibe tanto la actividad enzimática en forma directa betaglucuronidasa y lisozima como la desgranulación leucocitaria inducida por fMLP.
- Ayapina, en las condiciones evaluadas, inhibe en forma directa la actividad enzimática de elastasa, lisozima y betaglucuronidasa.
- Arbutina, en las condiciones evaluadas, sólo presenta inhibición de en forma directa de la actividad enzimática MPO.
- Los resultados de este trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento farmacológico de los principios activos amarisolide, ayapina y arbutina, apoyando así la base racional para el uso de las plantas *Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* en patologías que cursan con procesos inflamatorios.

## 8. RECOMENDACIONES

- Profundizar en el estudio del mecanismo de acción para amarisolide y ayapina, realizando estudios concentración-respuesta.
- Avanzar en la optimización de las técnicas recién implementadas para la determinación de lisozima y betaglucuronidasa.



## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R., Visser, S., Ramafi, G., y Theron, A. (2000). Accelerated resequestration of cytosolic calcium and suppression of the pro-inflammatory activities of human neutrophils by CGS 21680 *in vitro*. *Br. J. Pharmacol*, 130: 717-724.
- Ager, A. (2003). Inflammation: Border crossings. *Nature*, 421: 703-705.
- Békési, G., Heinle, H., Kakucs, R., Pázmány, T., Szombath, D., Dinya, M., Tulassay, Z., Fehér, J., Rácz, K., Székacs, B., Riss, É., Farkas, A., Gódor, F., Illyés, G. (2005). Effect of inhibitors of myeloperoxidase on the development of aortic atherosclerosis in an animal model. *Experimental Gerontology*, 40: 199-208.
- Callewaert, L., Masschalck, B., Deckers, D., Nakimbuqwe, D., Atanassova, M., Aertsen, A., Michiels, C. (2005). Purification of lvy a lysozyme inhibitor from *Escherichia coli*, and characterization of this specificity for various lysozymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 205-211.
- Carrel, R.; y Lomas, D. (2002). Alpha1-antitripsin deficiency. A model for conformational diseases. *N. Engl. J. Med*, 346: 45-53.
- Cheng, H., Xia B., Zhang, L., Zhou, F., Zhang, Y.X., Ye, M., Hu, Z.G., Li, J., Wang, Z.L., Li, C., Guo, Q.S. (2006). Matrine improves 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Pharmacological Research*, 53: 202-208.
- CYTED (1995). Manual de Técnicas de Investigación. 81-127.
- Costa, D., Marques, A., Reis, R., Lima, J.L., Fernandes, E. (2005). Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivates. *Free Radical Biology & Medicine*, 40: 632-640.
- Cuellar, J., Giner, R., Recio, M., Just, M., Mañez, S., Cerdá, M., Hostettman, K., Rios, J. (1997). Zanthasaponins A and B, antiphospholipase A<sub>2</sub> saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark. *J. Nat. Prod*, 60(11): 1158-1160.
- Daugherty, A., Dunn, J., Rateri, D., Hienecke, W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 94: 437-444.
- Dejana, E. (2006). The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis. *Nature Cell Biology*, 8: 105-107.

- Dinarello, C. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118: 503-508.
- Erzsébet, L., y Mócsai, A. (1999). Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochem. Pharmacol*, 57 (11): 1209-1214.
- Ferrándiz, M.L, en CYTED., (2002), Subprograma X. Programa X.6. "Técnicas in vitro para el estudio de Fármacos Antiinflamatorios". Impreso por Collado Oliver. España.
- Ferrándiz, M.L; Bustos, G. (1993). Desgranulación leucocitaria y generación de radicales oxigenados. Tesis Doctoral. Departamento de Farmacia. Universidad de Valencia. España.
- Fior, S., Vianelli, A., Gerola, P. (2009). A novel method for fluorometric continuous measurement of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity using 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) as substrate. *Plant Science*, 176: 130-135.
- Franco, L.A. (2006). "Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana*". Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- Freitas, M., Porto, G., Lima, J., Fernandes, E. (2007). Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clinical Biochemistry*, 41: 570-575.
- Freshney, I. (2000). "Culture of animals cells: a Manual of basic Technique". 4° edición. John Wiley and Sons Inc. 329-343.
- García Barriga, H. (1975). "Flora Medicinal Colombiana. Botánica médica". Colciencias (Tomo II p. 83, 303. Tomo III p. 308, 44). Bogotá. Colombia.
- García, L; Rojo, D.M; García, L., Hernández, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21: 214-216.
- Goldsby, R.A., Kindt, T., Osborne, B., Kudy, J. (2004). Immunology. Fifth edition. Chapter 15: Leukocyte migration and inflammation. Editorial Mc Graw Hill. New York. Pp 368.
- Gómez-Gerique, J.A. (2006). Utilidad de los marcadores de inflamación en el diagnóstico del riesgo cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, Volume 18, Supplement 1: 56-71.
- Gonçalves, A.; y Appelberg, R. (2000). Modulation of neutrophil influx with cell adhesion molecule specific antibodies during nonspecific and immune mediated inflammatory reactions.

- González, F.; y Vesga, M. (2003). "Caracterización química de algunos metabolitos secundarios de *Critoniella acuminata* (H.B.K) R.M King & H. Robinson y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria" Tesis Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Guzik, T.J., Korbut, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54: 469-487.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization. *Biochemical Pharmacology*, 39: 1341-1348.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., y Bullock, P. (2004). Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*, 18: 703-710.
- Hanson, J. (1998). Diterpenoids. *Natural Product Reports*, 15: 93-106.
- He, D., Kaleem, I., Qin, S., Dai, D., Liu, G., Li, C. (2010). Biosynthesis of glycyrrhetic acid 3-O-mono- $\beta$ -D-glucuronide catalyzed by  $\beta$ -D-glucuronidase with enhance bond selectivity in an ionic liquid/buffer biphasic system. *Process Biochemistry*.
- Henriksen, P., Sallenave, J.M. (2008). Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40: 1095-1100.
- Hobbs, A.J., Higgs, A., Moncada, S. (1999). Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39: 191-200.
- Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R., La Peyre, J. (2007). cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 957-968.
- Jefferson, R.A. The GUS reporter gene system. *Nature*, 342: 837-838.
- Johansson, S.; Goransson, U.; Luijendijk, T.; Backlund, A.; Claesson, P.; y Bohlin, L. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J. Nat. Prod*, 65: 34-41.
- Kimura, Y., Okuda, H., Kubo, M. (1994). Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 45: 131-139.
- Klebanoff, S. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte*

*Biology*, 77: 598-625.

- Koksel, O., Ozdulger, A., Tamer, L., Cinel, L., Ercil, M., Degirmenci, U., Unlu, S., Kanik, A. (2006). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *19*: 90-95.
- Kopprash, S., Leonhardt, W., Pietzsch, J., Kühne, H. (1997). Hypochlorite-modified low-density lipoprotein stimulates human polymorphonuclear leukocytes for enhance production of reactive oxygen metabolites, enzyme secretion, and adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*, 136: 315-324.
- Lau, D., y Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 111: 16-26.
- Liaudet, L., García, F., Szabo, C. (2000). Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*, 28: 37-52.
- Liu, Y., Shaw, S., Yang, L., Luscinskas, F., Parkos, C. (2004). Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *Journal of Ethnopharmacology*, 172: 7-13.
- Maes, D., Verdish, S., Debenedetti, S., Davio, C., Mangelinck, N.G., De Kimpe, N. (2005). Synthesis and structural revision of naturally occurring ayapin derivates. *Tetrahedron*, 61: 2505-2511.
- Maruti, S., Chang, J., Prunty, J., Bigler, J., Schwarz, Y., Shuying, S., King, I., Potter, J., Lampe, J. (2008). Serum B-Glucuronidase activity in response to fruit and vegetable supplementation: A controlled feeding study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 17: 1808-1812.
- McWilliams, A. (2003). Plant-Derived Drugs: Products, Technology, Applications. Business Communications Company Inc. USA. Chapter 1. Pp 1-6.
- Medina, D., Garavito, J., Luengas P., Calle J. (2007). Evaluación de actividad antiinflamatoria de una Feniletillamida: *Critoniella acuminata*. *Scientia et Technica*. Año XIII, No 33. UTP. ISSN 0122-1701.
- Mytar, B., Siedlar, M., Woloszyn, M., Ruggiero, I., Pryjma, J., Zembala, M., 1999. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumor cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br. J. Cancer*, 79: 737-743.
- Morley, J. (2006). Inflammation and asthma therapy: a false dawn. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 19: 200-204.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.

- Moutaery, A.A. (2005). Proglumide attenuates experimental colitis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56: 369-379.
- Nihei, K.; y Kubo, I. (2003). Identification of oxidation product of arbutin in mushroom tyrosinase assay system. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 2409-2412.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., y Moldawer, L.L. (2000). Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Critical Care Medicine*, 28 (Suppl): N3-N12.
- Oliveira, S., Quintal, S., Farias, V., Sayori, S., Campa, A. (2005). Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes and infection*, 8: 420-425.
- Ospina, L.F. (2000). "Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona", Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España.
- Panés, J. (1999). Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Pathophysiology*, 5: 271-282.
- Paul, W.E., y Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76: 241-251.
- Payá, M., Halliwell, B y Houlth, J.R. (1992). Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. *Free Radicals and Antioxidant in Biomedicine*, 17: 293-298.
- Pelletier, M., Roberge, C.J., Gauthier, M., Vandal, K., Tessier, P.A., Girard, D. (2001). Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J. Leukoc. Biol*, 70: 367-373.
- Pepper, I. (2005). Apuntes de inflamación, mecanismos de enfermedad y reacción del organismo. Unidad de patología general. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Pp 19.
- Raghav, S.K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 234-239.
- Rasmussen, E. (1999). Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In vitro and Molecular Toxicology*, 12: 47-58.

- Rioja, I., Úbeda, A., Terencio, M., Guillén, I., Riguera, R., Quintela, J., Peinador, C., González, L., y Alcaraz, M. (2000). An anti-inflammatory dithiazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-II. *Eur. J. Pharmacol*, 397: 207-217.
- Robbins, S.; Cotran, R.; y Kumar, V. (1996). "Patología estructural y funcional". 5° ed. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. Capítulo 3, p. 59-91.
- Rodríguez, M; y Vergel, N. (2004). "Evaluación de actividad enzimática de desgranulación leucocitaria en un modelo de inflamación aguda". Tesis Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez, M., Vergel, N., Ospina, L.F., Calle, J., y Pinzón, R. (2004). Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm*, 34 (1), 35-45.
- Rojas, W. (2007). "Inmunología". Capítulo 5. 14° edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín – Colombia. Pp. 78-100.
- Rojas, W., Anaya J., Aristizábal B., Cano L., Gómez L., Lopera D. (2007). "Inmunología". Capítulo 2. 14ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia. Pp. 20 y 32.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J., y Gómez, A. (2005). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitological Research*, 10: 57-61.
- Saleem, B., Cox, S., Emery, P. (2006). Biomarkers: strategies to predict outcome of rheumatoid arthritis. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3: 11-16.
- Sallusto, F., y Lanzavecchia, A. (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. Review Article. *Current Opinion in Immunology*, 12: 92-98.
- Simone, F., Vianelli, A., Gerola, P. (2008). A novel method for fluorometric continuous measurement of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity using 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) as substrate. *Plant Science*, 176: 130-135.
- Srinivasan, K., Muruganandan, S., Lal, J., Chandra, S., Tandan, S., Ravi Prakash, V. (2001). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 151-157.
- Tanigushi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine

kinases. *Science*, 268: 251-255.

- Texeira, M., Williams, T., Hellewell, P. (1995). Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation *in vivo*. *Trends Pharmacol. Sci*, 16: 418-423.
- Valenzuela, A. (2007). "Estudio sobre la ruta del metabolismo del Ácido Araquidónico como posible mecanismo de actividad antiinflamatoria para principios bioactivos de Plantas Medicinales Colombianas". Tesis Doctoral. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Daniel, M.A y Van Dyke, T. (1996). Alterations in phagocyte function and periodontal infection. *J. Periodontol*, 67:1070-1079.
- Velásquez, A. (2002). "Efecto inflamatorio y antioxidante de algunas plantas utilizadas en la medicina popular colombiana". Tesis Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Witko, V., Lesaure, P., Hailbwachs, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*, 80: 617-653.
- Zurabyan, S.E., Pimenova, V., Shashkova, A., Khorlin, A. (1971). Synthesis of modified lysozyme inhibitors by the oxazoline method. *Chemistry of Natural Compounds*. 7: 670-674.

## ANEXOS

### Anexo A

#### RESUMEN DE RESULTADOS

##### Inhibición enzimática por parte de los compuestos en estudio

COMPUESTOS	INHIBICIÓN ENZIMÁTICA (%)				
	MPO	ELASTASA	LISOZIMA PURA	LISOZIMA FUENTE	BETAGLUCURONIDASA
Ayapina	-	+	+	+	+
Amarisolide	+	-	+	+	+
Arbutina	+	-	-	-	-

$\lambda$  MPO: 620 nm,  $\lambda$  elastasa: 415 nm,  $\lambda$  lisozima: 450 nm,  $\lambda$  betaglucuronidasa: 540 nm. Media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento). Tratamientos = 100  $\mu$ M. +: Inhibición de la enzima, -: no presenta inhibición de la enzima.

##### Inhibición de los compuestos sobre la desgranulación leucocitaria *in vitro*

COMPUESTOS	INHIBICIÓN DE LA DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA (%)			
	MPO	ELASTASA	LISOZIMA	BETAGLUCURONIDASA
Ayapina	-	-	-	-
Amarisolide	+	-	+	+
Arbutina	-	-	-	-

PMNs humanos  $2,5 \times 10^6$  cél/mL.  $\lambda$  MPO: 620 nm,  $\lambda$  elastasa: 415 nm,  $\lambda$  lisozima: 450 nm,  $\lambda$  betaglucuronidasa: 540 nm. Media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento). Tratamientos = 100  $\mu$ M. +: Inhibición de la enzima, -: no presenta inhibición de la enzima.



## Anexo B

### CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS SOBRE PMNs HUMANOS

#### Ensayo del MTT

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

5 x 10<sup>6</sup> cél/mL

Tratamiento	Absorbancia 490 nm	Promedio	D.E	CV	% viabilidad	Promedio	D.E	CV
Blanco	0,0220	0,0222	0,005	22,0	--	--	--	--
	0,0270				--			
	0,0300				--			
	0,0198				--			
	0,0212				--			
	0,0257				--			
	0,0136				--			
	0,0215				--			
	0,0186				--			
Control	0,7526	0,6393	0,08	11,7	117,718	100	11,7	11,7
	0,6475				101,279			
	0,5378				84,120			
	0,6947				108,662			
	0,5678				88,813			
	0,6389				99,934			
	0,6946				108,646			
	0,6765				105,815			
	0,5435				85,012			
Amarisolide	0,6760	0,6081	0,05	8,0	105,737	95,1	7,6	8,0
	0,6052				94,663			
	0,5990				93,693			
	0,5897				92,238			
	0,6265				97,994			
	0,5823				91,081			
	0,6876				107,551			
	0,5376				84,089			
	0,5691				89,016			
Ayapina	0,6564	0,5760	0,06	10,0	102,671	90,1	9,0	10,0
	0,5262				82,306			
	0,6198				96,946			
	0,5165				80,789			
	0,5876				91,910			
	0,5598				87,561			
	0,4876				76,268			
	0,6387				99,903			
	0,5912				92,473			
Arbutina	0,6021	0,5784	0,04	6,6	94,178	90,5	6,0	6,6
	0,5675				88,766			
	0,6264				97,979			
	0,5478				85,684			
	0,5176				80,961			
	0,5897				92,238			
	0,6345				99,246			
	0,5487				85,825			
	0,5712				89,345			
Indometacina	0,6347	0,6213	0,04	6,8	99,277	97,2	6,6	6,8
	0,6853				107,192			
	0,6046				94,569			
	0,6546				102,390			
	0,5786				90,502			
	0,5487				85,825			
	0,6546				102,390			
	0,6276				98,166			
	0,6034				94,381			

## Anexo C

### CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS SOBRE PMNs HUMANOS

#### Ensayo de Resazurina

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

5 x 10<sup>6</sup> cél/mL

Tratamiento	Absorbacia	Promedio	D.E	CV	% viabilidad	Promedio	D.E	CV
Blanco	1868	1889	143,9	7,6	--	--	--	--
	1972				--			
	1716				--			
	2045				--			
	1987				--			
	1765				--			
	1654				--			
	1976				--			
	2017				--			
Control	41234	38653	2295,3	5,9	106,679	100	5,9	5,9
	40584				104,997			
	38567				99,779			
	37654				97,417			
	38765				100,291			
	34890				90,266			
	37651				97,409			
	36541				94,537			
	41987				108,627			
Amarisolide	38990	36441	2038,0	5,6	100,873	94,3	5,3	5,6
	37564				97,184			
	35123				90,869			
	34652				89,650			
	36789				95,179			
	39125				101,222			
	35847				92,742			
	32897				85,110			
	36983				95,681			
Ayapina	34275	35598	1754,5	4,9	88,675	92,1	4,5	4,9
	36758				95,098			
	38123				98,630			
	33765				87,355			
	36476				94,369			
	35764				92,527			
	34765				89,942			
	32987				85,342			
	37465				96,928			
Arbutina	42563	38370	2418,0	6,3	110,117	99,3	6,3	6,3
	37108				96,004			
	39563				102,355			
	38567				99,779			
	34098				88,217			
	39120				101,209			
	37123				96,043			
	36908				95,487			
	40276				104,200			
Indometacina	40627	38494	2877,0	7,5	105,108	99,6	7,4	7,5
	36563				94,594			
	42563				110,117			
	41876				108,340			
	38265				98,997			
	35908				92,899			
	39647				102,573			
	34098				88,217			
	36897				95,458			

## Anexo D

### INHIBICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MPO

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 620 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,9287	0,9020	0,03	3,3	100	0	--	--	--
	0,8596								
	0,9256								
	0,9418								
	0,9189								
	0,8834								
	0,9356								
	0,8745								
	0,9023								
	0,8576								
Ayapina	0,7235	0,7056	0,03	3,7	78,2	21,8	21,9	2,8	12,8
	0,7467								
	0,7365								
	0,7198								
	0,6934								
	0,6623								
	0,7123								
	0,7012								
	0,6834								
	0,7245								
Amarisolide	0,5502	0,5074	0,03	6,5	61,0	39,0	43,7	3,7	8,4
	0,5012								
	0,5467								
	0,5339								
	0,5023								
	0,4956								
	0,5278								
	0,5423								
	0,4987								
	0,4765								
Arbutina	0,6367	0,6038	0,05	7,7	70,6	29,4	33,1	5,1	15,5
	0,6412								
	0,6245								
	0,6326								
	0,5976								
	0,5765								
	0,6312								
	0,4865								
	0,5654								
	0,6478								
Indometacina	0,3624	0,3672	0,02	6,1	40,2	59,8	59,3	2,5	4,2
	0,3678								
	0,3567								
	0,389								
	0,3379								
	0,3287								
	0,3678								
	0,3589								
	0,4087								
	0,3786								
0,3598									
0,3897									

## Anexo E

### INHIBICIÓN DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA – ACTIVIDAD MPO

PMNs de sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 620 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,0812	0,0788	0,005	6,0	100	0	---	---	---
	0,0778								
	0,0804								
	0,0734								
	0,0845								
	0,0834								
	0,0856								
	0,0743								
	0,0723								
	0,0776								
Ayapina	0,0564	0,0593	0,003	5,6	75,2	24,8	24,5	4,1	16,6
	0,0622								
	0,0586								
	0,0571								
	0,0569								
	0,0673								
	0,0613								
	0,0582								
	0,0574								
	0,0565								
Amarisolide	0,0567	0,0559	0,003	6,2	71,9	28,1	29,2	4,4	15,1
	0,0556								
	0,0572								
	0,0542								
	0,0562								
	0,0515								
	0,0627								
	0,0523								
	0,0508								
	0,0605								
Arbutina	0,0703	0,0699	0,001	1,4	89,2	10,8	11,4	1,3	11,0
	0,0691								
	0,071								
	0,0693								
	0,0689								
	0,0716								
	0,0681								
	0,0695								
	0,0699								
	0,0701								
Indometacina	0,0406	0,0411	0,002	5,2	51,5	48,5	47,8	2,7	5,7
	0,0417								
	0,0438								
	0,0389								
	0,0437								
	0,0437								
	0,0378								
	0,0388								
	0,0408								
	0,0418								

## Anexo F

### INHIBICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ELASTASA

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 415 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,5380	0,5136	0,03	5,6	100	0	--	--	--
	0,5051								
	0,5135								
	0,5147								
	0,4967								
	0,5278								
	0,4478								
	0,5012								
	0,4923								
	0,5387								
	0,5587								
0,5287									
Ayapina	0,3378	0,3628	0,02	5,1	70,6	29,4	29,0	3,3	11,3
	0,3512								
	0,3678								
	0,3790								
	0,3587								
	0,3765								
	0,3845								
	0,3289								
	0,3576								
	0,3898								
	0,3698								
0,3523									
Amarisolide	0,3987	0,3898	0,02	4,4	77,6	22,4	24,1	3,3	13,8
	0,3976								
	0,3923								
	0,3712								
	0,3876								
	0,3923								
	0,4278								
	0,3845								
	0,4054								
	0,3765								
	0,3812								
0,3623									
Arbutina	0,4067	0,3972	0,02	3,9	79,2	20,8	22,7	3,0	13,3
	0,4156								
	0,4258								
	0,4078								
	0,3976								
	0,3765								
	0,4012								
	0,3865								
	0,3954								
	0,3778								
	0,3789								
0,3967									
Indometacina	0,4058	0,3931	0,01	2,6	79,0	21,0	23,5	2,0	8,4
	0,3818								
	0,4026								
	0,3967								
	0,4079								
	0,3787								
	0,3978								
	0,3989								
	0,3887								
	0,3786								
	0,3898								
0,3897									

## Anexo G

### INHIBICIÓN DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA – ACTIVIDAD ELASTASA

PMNs de sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 415 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,3152	0,3010	0,02	8,2	100	0	--	--	--
	0,2834								
	0,3576								
	0,2946								
	0,2767								
	0,3278								
	0,2678								
	0,3012								
	0,2826								
	0,3084								
0,2912									
0,3056									
Ayapina	0,2456	0,2551	0,01	4,2	84,7	15,3	15,0	3,4	22,9
	0,2356				78,3	21,7			
	0,2543				84,5	15,5			
	0,2456				81,6	18,4			
	0,2687				89,3	10,7			
	0,2765				91,9	8,1			
	0,2545				84,5	15,5			
	0,2589				86,0	14,0			
	0,2576				85,6	14,4			
	0,2598				86,3	13,7			
0,2498	83,0	17,0							
0,2543	84,5	15,5							
Amarisolide	0,2698	0,2544	0,01	5,4	89,6	10,4	15,5	4,6	29,5
	0,2445				81,2	18,8			
	0,2414				80,2	19,8			
	0,2698				89,6	10,4			
	0,2576				85,6	14,4			
	0,2323				77,2	22,8			
	0,2475				82,2	17,8			
	0,2542				84,4	15,6			
	0,2657				88,3	11,7			
	0,2765				91,9	8,1			
0,2412	80,1	19,9							
0,2523	83,8	16,2							
Arbutina	0,2298	0,2450	0,01	5,2	76,3	23,7	18,6	4,2	22,6
	0,2304				76,5	23,5			
	0,2476				82,3	17,7			
	0,2316				76,9	23,1			
	0,2576				85,6	14,4			
	0,2465				81,9	18,1			
	0,2312				76,8	23,2			
	0,2565				85,2	14,8			
	0,2554				84,8	15,2			
	0,2378				79,0	21,0			
0,2489	82,7	17,3							
0,2667	88,6	11,4							
Indometacina	0,2093	0,2123	0,01	6,1	69,5	30,5	29,5	4,3	14,7
	0,2165				71,9	28,1			
	0,2256				74,9	25,1			
	0,1964				65,2	34,8			
	0,2079				69,1	30,9			
	0,1987				66,0	34,0			
	0,2278				75,7	24,3			
	0,2089				69,4	30,6			
	0,2187				72,7	27,3			
	0,1886				62,7	37,3			
0,2198	73,0	27,0							
0,2297	76,3	23,7							

## Anexo H

### INHIBICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LISOZIMA PURA (MERCK)

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 450 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control Lisozima	0,2278	0,2239	0,02	8,8	100	0	--	--	--
	0,2067								
	0,1865								
	0,2247								
	0,2145								
	0,2373								
	0,2213								
	0,2254								
	0,2576								
	0,2465								
0,2365									
0,2016									
Lisozima-Ayapina	0,1264	0,1249	0,01	10,9	55,8	44,2	44,3	6,1	13,7
	0,1381								
	0,1112								
	0,1232								
	0,1034								
	0,1152								
	0,1376								
	0,1289								
	0,1334								
	0,1076								
0,1487									
0,1254									
Lisozima-Amarisolide	0,1378	0,1163	0,02	19,8	61,6	38,4	48,1	10,3	21,4
	0,1167								
	0,0756								
	0,1298								
	0,1097								
	0,1386								
	0,1176								
	0,1486								
	0,0965								
	0,1376								
0,0992									
0,0876									
Lisozima-Arbutina	0,158	0,1747	0,01	5,4	70,6	29,4	22,0	4,2	19,1
	0,184								
	0,173								
	0,166								
	0,183								
	0,1776								
	0,1631								
	0,1865								
	0,1654								
	0,1778								
0,1789									
0,1826									
Lisozima-Indometacina	0,0734	0,0999	0,03	25,1	32,8	67,2	55,4	11,2	20,2
	0,0940								
	0,1240								
	0,0632								
	0,129								
	0,107								
	0,1126								
	0,148								
	0,0838								
	0,0778								
0,0959									
0,0897									

## Anexo I

### INHIBICIÓN ACTIVIDAD LISOZIMA OBTENIDA DE FUENTE ENZIMÁTICA

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Control Fuente	0,2134	0,2120	0,02	10,5	100	0	--	--	--
	0,1893								
	0,2167								
	0,1893								
	0,2178								
	0,2178								
	0,1783								
	0,1987								
	0,2576								
	0,2265								
	0,2365								
0,2016									
Fuente-Ayapina	0,1239	0,1475	0,02	12,4	69,6	30,4	29,5	7,9	26,8
	0,1477				69,7	30,3			
	0,1648				77,8	22,2			
	0,1167				55,1	44,9			
	0,1535				72,4	27,6			
	0,1452				68,5	31,5			
	0,1563				73,7	26,3			
	0,1664				78,5	21,5			
	0,1434				67,7	32,3			
	0,1776				83,8	16,2			
	0,1487				70,2	29,8			
0,1254				59,2	40,8				
Fuente-Amarisolide	0,1613	0,1515	0,02	10,2	76,1	23,9	28,5	7,3	25,7
	0,1764				83,2	16,8			
	0,1579				74,5	25,5			
	0,1699				80,2	19,8			
	0,1485				70,1	29,9			
	0,1509				71,2	28,8			
	0,1654				78,0	22,0			
	0,1467				69,2	30,8			
	0,1265				59,7	40,3			
	0,1476				69,6	30,4			
	0,1292				61,0	39,0			
0,1376				64,9	35,1				
Fuente-Arbutina	0,1797	0,1793	0,01	5,6	84,8	15,2	15,4	4,8	30,9
	0,1887				89,0	11,0			
	0,1956				92,3	7,7			
	0,1875				88,5	11,5			
	0,1898				89,5	10,5			
	0,1856				87,6	12,4			
	0,1723				81,3	18,7			
	0,1645				77,6	22,4			
	0,1698				80,1	19,9			
	0,1785				84,2	15,8			
	0,1723				81,3	18,7			
0,1676				79,1	20,9				
Fuente-Indometacina	0,1458	0,1343	0,03	20,6	68,8	31,2	36,6	13,1	35,7
	0,1239				58,5	41,5			
	0,1234				58,2	41,8			
	0,1586				74,8	25,2			
	0,0877				41,4	58,6			
	0,1765				83,3	16,7			
	0,1387				65,4	34,6			
	0,1099				51,8	48,2			
	0,1038				49,0	51,0			
	0,1178				55,6	44,4			
	0,1559				73,6	26,4			
0,1697				80,1	19,9				





## Anexo K

### DETERMINACIÓN ACTIVIDAD LISOZIMA PURA

Sangre periférica humana "buffy coat"

Viabilidad inicial > 90%

<b>LISOZIMA (U/mL)</b>	<b>Δ ABSORBANCIA 450 nm</b>								<b>PROM</b>	<b>DESV</b>	<b>CV</b>
<b>100.000</b>	0,95	0,967	0,935	0,874	0,876	0,982	0,826	0,973	0,923	0,057	6,19
<b>40.000</b>	0,689	0,764	0,665	0,623	0,765	0,623	0,724	0,735	0,699	0,058	8,26
<b>30.000</b>	0,567	0,467	0,675	0,578	0,652	0,546	0,489	0,547	0,565	0,072	12,67
<b>20.000</b>	0,436	0,376	0,436	0,389	0,378	0,321	0,412	0,318	0,383	0,046	11,93
<b>10.000</b>	0,209	0,1789	0,1865	0,22	0,1768	0,217	0,221	0,176	0,198	0,020	10,32

## Anexo L

### INHIBICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA BETAGLUCURONIDASA

Sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 540 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,9635	0,9526	0,04	4,1	100	0	--	--	--
	0,9786								
	0,9527								
	0,9712								
	0,9453								
	0,8348								
	0,9556								
	0,9743								
	0,9423								
	0,9776								
Ayapina	0,8264	0,7121	0,06	8,6	74,7	25,3	26,3	5,2	20,0
	0,7945								
	0,6246								
	0,6926								
	0,7293								
	0,7623								
	0,6423								
	0,7012								
	0,7334								
	0,6945								
Amarisolide	0,6061	0,6327	0,06	10,2	63,6	36,4	33,6	6,8	20,2
	0,6135								
	0,7867								
	0,6014								
	0,6502								
	0,7195								
	0,6527								
	0,6423								
	0,5798								
	0,5765								
Arbutina	0,8035	0,7890	0,03	4,3	84,3	15,7	17,2	3,5	20,6
	0,8135								
	0,8265								
	0,7925								
	0,7597								
	0,7676								
	0,7631								
	0,7865								
	0,8654								
	0,7478								
Indometacina	0,5887	0,5949	0,09	15,4	61,8	38,2	37,5	9,6	25,5
	0,4101								
	0,6897								
	0,5013								
	0,6437								
	0,5287								
	0,5678								
	0,6358								
	0,7408								
	0,6378								
	0,5359				56,3	43,7			
	0,6589				69,2	30,8			

## Anexo M

### INHIBICIÓN DESGRANULACIÓN LEUCOCITARIA – ACTIVIDAD BETAGLUCURONIDASA

PMNs de sangre periférica humana "buffy coat"

Concentración compuestos: 100 µM

Viabilidad inicial > 90%

Tratamiento	Absorbancia 540 nm	Promedio	D.E	CV	% Actividad	% inhibición	Promedio	D.E	CV
Control	0,6342	0,6412	0,03	4,7	100	0	--	--	--
	0,6041								
	0,6123								
	0,6784								
	0,6453								
	0,6348								
	0,6556								
	0,6743								
	0,6423								
	0,6776								
	0,5823								
0,6532									
Ayapina	0,5235	0,5216	0,04	7,3	81,3	18,7	18,7	6,0	32,0
	0,5067				79,0	21,0			
	0,5165				80,6	19,4			
	0,5098				79,5	20,5			
	0,4993				77,9	22,1			
	0,4983				77,7	22,3			
	0,5023				78,3	21,7			
	0,5012				78,2	21,8			
	0,5034				78,5	21,5			
	0,4945				77,1	22,9			
	0,6012				93,8	6,2			
0,6023	93,9	6,1							
Amarisolide	0,4502	0,4630	0,02	4,0	70,2	29,8	27,8	2,9	10,4
	0,4712				73,5	26,5			
	0,4667				72,8	27,2			
	0,4839				75,5	24,5			
	0,4402				68,7	31,3			
	0,4595				71,7	28,3			
	0,4927				76,8	23,2			
	0,4423				69,0	31,0			
	0,4898				76,4	23,6			
	0,4565				71,2	28,8			
	0,4412				68,8	31,2			
0,4623	72,1	27,9							
Arbutina	0,5067	0,5072	0,01	2,3	79,0	21,0	20,9	1,8	8,7
	0,4912				76,6	23,4			
	0,5145				80,2	19,8			
	0,5026				78,4	21,6			
	0,5097				79,5	20,5			
	0,5076				79,2	20,8			
	0,5031				78,5	21,5			
	0,5265				82,1	17,9			
	0,4954				77,3	22,7			
	0,5278				82,3	17,7			
	0,5089				79,4	20,6			
0,4926	76,8	23,2							
Indometacina	0,5624	0,5763	0,02	3,1	87,7	12,3	10,1	2,8	27,3
	0,5778				90,1	9,9			
	0,5667				88,4	11,6			
	0,5789				90,3	9,7			
	0,5537				86,4	13,6			
	0,5987				93,4	6,6			
	0,5578				87,0	13,0			
	0,5858				91,4	8,6			
	0,5508				85,9	14,1			
	0,5978				93,2	6,8			
	0,5859				91,4	8,6			
0,5989	93,4	6,6							

## Anexo N

### DETERMINACIÓN VOLUMENES PARA DETERMINAR ACTIVIDAD BETAGLUCURONIDASA

PMNs de sangre periférica humana "buffy coat"

Viabilidad inicial > 90%

Sobrenadante μL	Glucurónido de fenolftaleína μL	Absorbancia (540 nm)					Promedio	D.E	CV
20	100	0,2734	0,2564	0,2276	0,2765	0,2897	0,2647	0,02	9,0
60	60	0,5923	0,5512	0,5598	0,5187	0,5876	0,5619	0,03	5,3
80	40	0,8567	0,9023	0,8456	0,8823	0,8823	0,8738	0,02	2,6
100	30	0,9564	0,9023	0,9376	0,9534	0,9923	0,9484	0,03	3,4
110	20	0,8032	0,8545	0,8712	0,8123	0,7934	0,8269	0,03	4,1
120	10	0,7267	0,7623	0,7054	0,7812	0,7534	0,7458	0,03	4,0