



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Actividad anti-inflamatoria de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium decompositum* (Gray) Rob. & Brett. en modelo de TPA y en la línea celular de macrófagos RAW 264.7.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA:**

Biol. Exp. Beatriz Mora Ramiro

COMITÉ TUTORAL:

Director.

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.

Asesor interno.

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Asesor externo.

Dr. Manuel Jiménez Estrada.

23 de noviembre de 2016

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada a la alumna Beatriz Mora Ramiro con el Número de Becario 570655

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada "**Actividad anti-inflamatoria de compuestos sesquiterpénicos aislados de *Psacalium decompositum* (Gray) Rob. & Brett. en modelo de TPA y en la línea celular de macrófagos RAW 264.7**", que presentó la Lic. en Biología Experimental Beatriz Mora Ramiro el día 23 de noviembre de 2016.

Presidente:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.
Profesor titular C.
Depto. Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
aaaf@xanum.uam.mx



Secretario:

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.
Profesor titular B.
Laboratorio de Fitoquímica
Centro de investigación médica del Sur (CIBIS)-IMSS
azamilpa_2000@yahoo.com.mx



Vocal 1:

Dr. Fausto Sánchez Muñoz.
Investigador en Ciencias Médicas D.
Dpto. de Inmunología.
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".
fausto22@yahoo.com



Vocal 2:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.
Investigador Titular C.
Laboratorio de Fisiología Celular
Depto. Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
legq@xanum.uam.mx



Director.

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.

Profesor titular C.

Depto. Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

jcaph@xanum.uam.mx

Asesor interno

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Profesor titular C.

Depto. Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

aaaf@xanum.uam.mx

Asesor externo.

Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Profesor titular C.

Depto. Productos Naturales.

Universidad Nacional Autónoma de México.

manuelj@unam.mx

DEDICATORIA

A mis padres: Valentina y Dario

Por ser el pilar fundamental de todo lo que soy como persona, por su apoyo incondicional en mí desarrollo académica, pero sobre todo, por enseñarme a amar y valorar todo lo que tengo en mi vida.

Por su incondicional apoyo, por infundirme siempre el valor para salir adelante, por su constante motivación para ser una persona de bien, pero principalmente por su amor.

Este trabajo y mis logros han sido posibles solo gracias a ustedes.

A mis hermanos: Guillermo y Carlos

Por participar de forma directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis, pero sobre todo por aportar cosas buenas en mi vida y por los grandes momentos de felicidad y diversas emociones que hemos compartido. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Julio Cesar Almanza**, por su confianza, sus consejos, su paciencia, por asesorarme desde la licenciatura y ayudarme en mi formación como investigadora, pero, sobre todo, por brindarme su amistad... ¡Gracias!

Al **Dr. Manuel Jiménez Estrada** por las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio, por su orientación, sus consejos, sugerencias y por compartir sus conocimientos en el campo de la química.

Al **Dr. Francisco Javier Alarcón** por su disponibilidad y amabilidad, además de sus comentarios y consejos que permitieron enriquecer mi trabajo.

A los **Doctores Fausto Sánchez Muñoz y Alejandro Zamilpa Álvarez** por sus valiosas observaciones a esta tesis.

A mis **compañeros del Laboratorio de Farmacología**, Abraham, Diana, Erika, Elizabeth, Iván, al Dr. Gerardo y la Dra. Ángeles por sus conocimientos, su ayuda, sus

ocurrencias y sobre todo por hacer que cada día el trabajo en el laboratorio sea agradable y divertido.

A mis **compañeros del Laboratorio 2-10 del Instituto de Química**, Rosario, Paty, Miguel, Rosa y Javier por su ayuda en cada momento, por todo lo que me enseñaron y por todos los momentos divertidos que pasamos juntos.

A **mis amigos** que de alguna forma me apoyaron durante este tiempo, Wendy, Arturo, Gerardo, Gibran, Soraya, Bea, Memo, Joel, Jhovan, Liz, Laura, Lupita, Mari, Ivón y Lalo por sus consejos, risas y sobre todo por estos años de amistad.

Si olvide a alguien disculpen pero gracias por su apoyo

ABREVIATURAS

5-LO	Lipoxigenasa
AA	Ácido araquidónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APP	Proteínas de Fase Aguda
ARN	Ácido ribonucleico
Ca²⁺	Calcio
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
COX-1	Ciclooxigenasa1
COX-2	Ciclooxigenasa2
DEPC	Dietilpirocarbonato
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
ICAM	Moléculas de Adhesión Intercelular
IFN-γ	Interferón Gamma
IL-1	Interleucina1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

iNOS	Óxido nítrico inducible
IκB	Inhibidor de κB
LBP	Proteína de unión al LPS
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MMPs	Metaloproteinasa de la matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Metiltiazoltetrazolio
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
NOS	Especie Reactivas de Nitrógeno
•O₂⁻	Anión superóxido
•OH	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OONO⁻	Peroxi nitríto
PAF	Factor Agregador de Plaquetas
PBS	Buffer Fosfato Salino
PG	Prostaglandinas
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa citosólica A2

PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Transcripción en Reversa acoplado a Reacción en Cadena de la Polimerasa
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TX	Tromboxanos
VCAM	Moléculas de Adhesión Intercelular Vasculares

RESUMEN

Introducción.

La inflamación es una respuesta adaptativa que se desencadena por diversos estímulos nocivos y cuyo objetivo es la eliminación de un agente dañino, así como el restablecimiento y funcionamiento normal del tejido u órgano afectado. Esta respuesta puede alterarse produciendo daño permanente y consecuencias patológicas asociadas con enfermedades cardiovasculares, respiratorias, digestivas o autoinmunes. Hoy en día existe un gran número de fármacos antiinflamatorios, esteroideos y no esteroideos, los cuales ejercen su acción farmacológica mediante el bloqueo de moléculas mediadoras de la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se ha reportado que, independientemente de la naturaleza esteroidea o no esteroidea de los fármacos antiinflamatorios, cuando se consumen por periodos largos pueden generar efectos adversos, lo cual justifica la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios. México cuenta con gran variedad de especies vegetales con diferentes usos medicinales. *Psacalium decompositum* se usa en la medicina tradicional como antidiabética y antiinflamatoria. Entre los principales compuestos identificados en *P. decompositum* se encuentran el cacalol y una fracción rica en fructooligosacáridos (FOS), los cuales se han reportado con actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda y en modelo de síndrome metabólico respectivamente. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su acción antiinflamatoria.

Objetivo.

Determinar la actividad antiinflamatoria del cacalol, acetato de cacalol y la fracción rica en fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum* en macrófagos RAW 264.7.

Materiales y métodos.

Para el modelo *in vivo* se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1, a los que se les indujo inflamación tópica mediante la administración de TPA (2.5 µg) en la oreja; posteriormente se administraron los compuestos cacalol, acetato de cacalol y la fracción FOS, así como el extracto hexánico y el extracto acuoso (1 µg/oreja). Para el estudio *in vitro* se cultivaron macrófagos de la línea RAW 264.7, los cuales fueron estimulados con LPS (5 µg/mL) para inducir una respuesta inflamatoria; posteriormente se trataron por diferentes tiempos (15, 30, 60, 90 y 240 minutos), con los compuestos cacalol (100 µM), acetato de cacalol (100 µM) y la fracción FOS (1 µg/mL), así como el extracto hexánico (10 µg/mL) y el extracto acuoso (10 µg/mL), utilizando como control positivo dexametasona (50 µM). Al final de los tratamientos la expresión del ARNm de TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10 y COX-2 se midió por qPCR; las concentraciones de las citocinas TNF- α, IL-6, IL-1β e IL-10 en el medio de cultivo y la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB se determinaron por el método de ELISA.

Resultados.

Los resultados mostraron que tanto el cacalol como su acetato inhibieron significativamente el desarrollo del edema auricular en un 40% con respecto al control (vehículo), el extracto hexánico lo inhibió en un 39.2% y la fracción FOS en un 28%. En macrófagos RAW 264.7 los compuestos disminuyeron significativamente la expresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , así como sus concentraciones en el cultivo. No se detectaron cambios en la expresión ni en la concentración de IL-10. La concentración de la subunidad p65 fosforilada disminuyó con los extractos y con los compuestos aislados.

Conclusión.

El cacalol, el acetato de cacalol, la fracción FOS y los extracto hexánico y acuoso redujeron la inflamación y suprimieron las concentraciones de citocinas proinflamatorias, sin afectar las antiinflamatorias, lo cual podría estar relacionado con inhibición de la vía NF- κ B, ya que los nivel de la subunidad de p65 fosforilada fueron reducidos. Es necesario continuar el estudio de los factores de transcripción implicados en la regulación de dichas citocinas.

ABSTRACT

Introduction.

Inflammation is an adaptative response, triggered by various harmful stimuli, its aim is to eliminate injurious agents, as well as the restoration and normal functioning of the affected tissue or organ. However, this response can be altered and produce permanent damage, which often have pathological consequences, like cardiovascular, respiratory, digestive or autoimmune diseases. For this reason, there is a large number of anti-inflammatory drugs nowadays, such as esteroideal and non-esteroideal drugs, they have pharmacological action mainly by blocking initiation and amplification mediators of the inflammatory response. It has been reported, nevertheless, that the consumption of anti-inflammatory drugs for long periods may cause adverse effects, which brings us to the pursuit of new anti-inflammatory compounds.

Mexico is a country with a very large variety of plant species with diverse medicinal uses, an example of this is *Psacalium decompositum*, a plant with diverse uses in traditional medicine, among which its antidiabetical and anti-inflammatory properties stand out. Among the main compounds that have been identified in *P. decompositum*, are cacalol and a rich in fructooligosaccharides (FOS) fraction. It remains unknown if this compounds are responsible for anti-inflammatory action.

Objective.

Determine the anti-inflammatory activity of the cacalol, cacalol acetate and the fraction rich in fructooligosaccharides of *Psacalium decompositum* in RAW 264.7 macrophages.

Materials and methods.

For the in vivo model, male mice of the CD-1 strain were used to induce topical inflammation by the administration of TPA (2.5 µg) in the ear and subsequently the compounds cacalol, cacalol acetate and the fraction FOS as well as the hexanic extract and the aqueous extract (1 µg/ear).

For the in vitro study, RAW 264.7 macrophages were cultured and stimulated with LPS (5 µg/mL) to induce an inflammatory response and subsequently treated at different times (15, 30, 60, 90 and 240 minutes) with the compounds cacalol (100 µM), cacalol acetate (100 µM), the FOS fraction (1µg/mL) and the aqueous extract (10 µg/mL), using dexamethasone as positive control (50 µM).

After the treatments, the expression of the TNF- α, IL-6, IL-1β, IL-10 and COX.2 mRNAs was assessed by qPCR, cytokine concentrations (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10) were measured in the culture medium by the ELISA method and phosphorylation of p65 subunit of NF-κB by the ELISA method.

Results.

The results showed that both cacalol and cacalol acetate significantly inhibited the development of ear edema by up to 40% compared to the control (only treated with

vehicle), unlike the hexanic extract that inhibited 39.2% and the FOS fraction which only inhibited it by 28%. Furthermore, in RAW 264.7 macrophages the compounds significantly decreased the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β , as well as their concentrations in the culture medium. No changes were detected in the expression or concentration of IL-10. The concentrations of the phosphorylated p65 subunit decreased with the extracts and with the isolated compounds.

Conclusion.

Cacalol, cacalol acetate, as well as the FOS fraction and hexane and aqueous extract, reduce inflammation through the modulation of inflammatory cytokines, suppressing the pro-inflammatory ones; however, they do not modify anti-inflammatory cytokines. This effects could be involved in the inhibition of the NF- κ B pathway as it decreases the level of the phosphorylated p65 subunit. Even so, it is necessary to continue the study with the transcription factors involved in the regulation of these cytokines.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Sistema inmunológico.	1
1.1.1 Los monocitos y los macrófagos.....	2
1.1.2 Activación del macrófago.....	3
1.2 Proceso inflamatorio.	4
1.2.1 Mediadores inflamatorios.....	7
1.2.2 Reacción inflamatoria.	9
1.2.3 El LPS como factor inductor del proceso inflamatorio por la vía de NF-κB. 12	
1.2.4 Fisiopatología de la inflamación.....	15
1.3 Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria.	17
1.3.1 Modelo de edema en oreja inducido por TPA.....	18
1.3.2 Modelo de estimulación de macrófagos con LPS.	19
1.4 Tratamientos farmacológicos para la inflamación.	20
1.5 Medicina tradicional utilizada en la inflamación.....	23
2. ANTECEDENTES.	25
2.1 Complejo matarique.	25
2.1.1 <i>Psacalium decompositum</i> (A. Gray) H. Rob. & Brettell.	25
2.1.2 Pruebas biológicas y compuestos aislados de <i>Psacalium decompositum</i> . 27	

3. JUSTIFICACIÓN.	32
4. HIPÓTESIS.	33
5. OBJETIVO GENERAL.....	34
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
7. MATERIAL Y MÉTODO.	35
7.1 Material vegetal.....	35
7.2 Obtención de los extractos de la raíz de <i>Psacalium decompositum</i>	35
7.2.1 Obtención de cacalol.	36
7.2.2 Obtención del acetato de cacalol.....	37
7.2.3 Obtención de la fracción de fructooligosacáridos.....	38
7.3 Modelo de evaluación antiinflamatoria <i>in vivo</i>	38
7.3.1 Animales de experimentación.....	38
7.3.2 Edema auricular inducido con TPA.....	39
7.4 Modelo <i>in vitro</i>	40
7.4.1 Línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón.	40
7.4.2 Viabilidad celular.....	41
7.4.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10).	42
7.4.4 Análisis de la transcripción génica de citocinas inflamatorias.	43

7.4.5 Activación de NF-kB.	45
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	46
9. RESULTADOS.	47
9.1 Análisis fitoquímico.	47
9.1.1 Obtención del cacalol.	47
9.1.2 Obtención del acetato de cacalol.	48
9.2 Evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	49
9.2.1 Efecto anti-inflamatorio en el modelo de edema auricular.	49
9.2.2 Prueba de funcionalidad celular en las células RAW 264.7 por MTT.	51
9.2.3 Secreción de TNF- α , IL-6, IL- β e IL-10.	52
9.2.4 Expresión de los genes de TNF- α , IL-6, IL1 β , IL-10 y COX-2.	57
9.2.5 Determinación de la fosforilación de p65 subunidad de NF κ B.	60
10. DISCUSIÓN.	61
11. CONCLUSIONES.	70
12. PERSPECTIVAS.	71
13. REFERENCIAS.	72
14. ANEXOS.	81

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Sistema inmunológico.

El sistema inmunológico de los vertebrados consiste en una serie de órganos y tejidos constituido por diferentes tipos celulares que tienen como función específica reconocer agentes externos y eliminarlos (Barrette AM1 2016).

Las células del sistema inmunológico están presentes normalmente como células circulantes en la sangre o en la linfa, así como en grupos anatómicamente definidos en los órganos y tejidos linfoides, o como células dispersas residentes en los tejidos (van der Spek, Fliers et al. 2016). A grosso modo, las células del sistema inmune se pueden dividir en tres grandes grupos: 1) los linfocitos, que reconocen y responden de forma específica ante los antígenos extraños; 2) Las células accesorias, las cuales contribuyen a que los linfocitos reconozcan los agentes extraños y se activen, ejemplo de éstas son las células presentadoras de antígeno; 3) Las células efectoras, que ayudan a los linfocitos activados a desempeñar su función, se incluyen en éstas a los macrófagos y los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos). También los linfocitos estimulados por el antígeno pueden funcionar como células efectoras (Abraham and Medzhitov 2011, Buckley, Gilroy et al. 2013, Fullerton and Gilroy 2016).

Una de las primeras células que actúa a partir de que el antígeno es reconocido es el macrófago, particularmente el monocito, ya que éste recibe el estímulo quimioatrayente a la región donde se encuentra el antígeno (Siczek, Zatorski et al. 2016).

1.1.1 Los monocitos y los macrófagos.

El sistema fagocítico mononuclear constituye una población celular importante en el sistema inmune y tienen como función básica la fagocitosis. Los macrófagos son células en diferenciación terminal que se originan de una célula precursora ubicada en la médula ósea. Todos los macrófagos pertenecen al linaje denominado sistema monocito-macrófago, que deriva de los glóbulos blancos circulantes conocidos como monocitos. Los monocitos son células de 12 a 20 μm , con núcleo arriñonado, sin cromatina, con un citoplasma abundante que contienen organelos necesarios para sintetizar proteínas secretoras y de membrana (Kratofil, Kubes et al. 2016). Uno de sus organelos más importante son los lisosomas, que contiene una gran variedad de componentes enzimáticos.

Los monocitos constituyen entre el 1 y el 6% de las células nucleadas circulantes de la sangre. Estas entidades celulares circulan como monocitos aproximadamente durante 24 horas, pasando este tiempo pasan a formar parte permanente de un tejido determinado. Al entrar en estos tejidos sufren cambios en su morfología y las funciones a desempeñar dependen de factores del micro ambiente local, adquiriendo diferentes nombres. Por ejemplo en el páncreas se llaman células de Langerhans, en el hígado células de Kupffer y en el hueso osteoclastos (Filep 2013, Freire and Van Dyke 2013, Ip and Medzhitov 2015).

Sin embargo, para que el macrófago active a todo el sistema inmune, como mecanismo de defensa, depende de la activación del mismo.

1.1.2 Activación del macrófago.

Un macrófago tisular tiene una vida media aproximada de 2 a 4 meses. En los tejidos existen estímulos variados (por ejemplo opsoninas, factores quimiotácticos, citoquinas y hormonas) que inducen la activación del macrófago, incrementando rápidamente su metabolismo, motilidad y actividad fagocítica (Medzhitov 2007, Decano, Mattson et al. 2016). Los macrófagos activados fagocitan a la mayoría de las partículas extrañas o restos celulares que encuentran a su alrededor. Se mueven más lentamente que los neutrófilos, pero tienen la ventaja de poseer una vida más prolongada. Debido a diversas propiedades de su membrana celular los macrófagos reconocen de forma directa a algunas partículas diana, lo cual puede inducir la activación de vías de señalización, como la del NF- κ B (Jones, Robb et al. 2016). Estas células participan en gran medida en la respuesta inmune innata haciendo frente a infecciones producidas por diferentes microorganismos. Esto se debe a la presencia de receptores a ligandos como por ejemplo: receptores a lipoproteínas, proteínas, polisacáridos, fosfolípidos y otras moléculas que caracterizan a un gran número de microorganismos como el lipopolisacárido (LPS). Este último, es uno de los antígenos más estudiados y documentados, por la información que proporciona en modelos en los que se induce una respuesta inflamatoria (Jantsch, Binger et al. 2014).

Los macrófagos no sólo presentan actividad fagocítica, sino que también secretan una enorme variedad de sustancias activas biológicamente como son:

- Enzimas: lisozimas, proteasas, colagenasas, elastasas,

- Hidrolasas ácidas: proteasas, lipasas, ribonucleasas, fosfatasas, glicosidasas.
- Componentes del complemento: C1, C2, C3, C4, C5, properdina, inactivador del C3B, factor B y D.
- Inhibidores de enzimas.
- Proteínas de ligación: transferrina, fibronectina, transcobalamina II.
- Metabolismo del oxígeno: O_2^- , H_2O_2 , y radicales hidroxilo.
- Metabolismo del nitrógeno: la producción de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (por ejemplo por LPS+IFN- γ).
- Lípidos bioactivos: prostaglandina E2 (PGE2) tromboxano, leucotrienos, eicosanoides, factor agregador de plaquetas (PAF).
- Factores activadores de neutrófilos: Interleucinas, factor estimulador de fibroblastos (Jantsch, Binger et al. 2014, Kotas and Medzhitov 2015)

1.2 Proceso inflamatorio.

El sistema inmune es esencial para combatir las infecciones, pero también participa en el desarrollo de fenómenos inflamatorios. Sin embargo, a pesar de que el objetivo sea frenar el crecimiento de microorganismos este proceso causa lesiones locales y/o generales, siendo a veces difícil discernir entre los aspectos beneficiosos y perjudiciales (Filep 2013)

El proceso inflamatorio se puede definir como una respuesta biológica natural de defensa a través de la cual un tejido vascularizado responde a los estímulos internos

o externos que han lesionado su integridad. Este proceso tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado, implicando así a las células circulantes, los vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares (Gautam, Jachak et al. 2011). Los signos macroscópicos que suelen acompañar la inflamación son: incremento de la temperatura (calor), eritema (rubor), edema (hinchazón o reacción inmediata o transitoria) y algesia (dolor), así como la pérdida de la función tisular en casos de inflamación crónica. Estos signos son consecuencia de efectos inducidos por los mediadores proinflamatorios (prostaglandinas y citocinas) en el flujo sanguíneo local, la permeabilidad vascular, la infiltración de leucocitos y la liberación de agentes inductores de dolor. Su objetivo es promover la eliminación del agente dañino y restaurar el funcionamiento normal del tejido u órgano afectado. Sin embargo, el balance puede perderse produciendo un fallo de forma permanente, que puede tener consecuencias patológicas (Medzhitov 2008, Cho, Ryu et al. 2013, Cho, So et al. 2014)

Dependiendo de su origen y duración, la inflamación se puede clasificar en dos:

- **Inflamación aguda.** Es aquella que se presenta en un lapso relativamente corto con una duración de minutos, horas o de pocos días. Sus principales características son el aumento del diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilatación), lo cual lleva a la exudación de fluidos. Ésta es la razón del enrojecimiento y aumento de temperatura en la zona lesionada. Continúa con un aumento en la permeabilidad vascular como resultado de una disminución de las uniones intercelulares, lo que se traduce en mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos cercanos, permitiendo incluso el paso de proteínas

plasmáticas. El resultado es la acumulación de líquido (edema) en el tejido. Le sigue la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia el sitio de la lesión (extravasación) por medio de quimiotaxis. La migración se inicia con una serie de eventos como la producción de mediadores inflamatorios: citocinas proinflamatorias (interleucinas: IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12; factor de necrosis tumoral: TNF- α e INF- γ), mediadores lipídicos (prostaglandinas: PG, leucotrienos: LT, tromboxanos: TX y factor activador de plaquetas: PAF), aminas (histamina y serotonina), NO, especies reactivas de oxígeno y proteasas plasmáticas (factor de complemento (C3) y cinasas, entre otros (Kotas and Medzhitov 2015, Fullerton and Gilroy 2016).

- Inflamación crónica. Es una respuesta prolongada de la inflamación que no pudo ser reparada por sobreproducción de mediadores inflamatorios (prostaglandinas, TNF- α , IL-6, NO). Tiene una duración de semanas o meses y presenta un flujo de linfocitos, macrófagos y crecimiento de fibroblastos. Se caracteriza por la destrucción de tejido y en algunos casos se produce lesión tisular por las altas concentraciones de enzimas hidrolíticas y especie reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, NOS), que puede concluir en la pérdida de la función de la parte afectada. Un ejemplo de enfermedad que involucra inflamación crónica es la artritis reumatoide (Schetter, Heegaard et al. 2010).

1.2.1 Mediadores inflamatorios.

Los mediadores inflamatorios pueden clasificarse en diferentes grupos dependiendo de sus propiedades bioquímicas: aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fragmentos de componentes del complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas, ROS, NOS y enzimas proteolíticas.

- Aminas vasoactivas (histamina y serotonina). Se producen cuando hay desgranulación de plaquetas y mastocitos. Éstas tienen efectos complejos sobre la vasculatura, causando un aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación o vasoconstricción, dependiendo del estímulo (Medzhitov 2008).
- Fragmentos del complemento (C3a, C4a y C5a) también conocidos como anafilotoxinas. Se producen por varias vías de activación del complemento. C5a (y en menor medida C3a y C4a) promueven el reclutamiento de granulocitos y monocitos e inducen la desgranulación de los mastocitos, lo que afecta el sistema vascular (Medzhitov 2008).
- Mediadores lipídicos (eicosanoides y factores activadores de plaquetas). Se derivan de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, que están presentes en la cara interna de las membranas celulares. Después de la activación por iones de Calcio (Ca^{2++}) intracelular, la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2) genera ácido araquidónico (AA) y ácido lisofosfatídico, a partir de fosfatidilcolina. El ácido araquidónico se metaboliza para formar eicosanoides, ya sea por ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), y con ellos se promueve la producción de PG y TX; o por lipoxigenasa (LPO), que generan LT y lipoxinas (LX). PGE2

y PGI₂ causan vasodilatación; PGE₂ también genera hiperalgesia y es considerado un potente inductor de la fiebre. La segunda clase de mediadores lipídicos son los factores activadores de plaquetas, los cuales son generados por la acetilación de ácido lisofosfatídico y activan varios procesos que se producen durante la respuesta inflamatoria, incluyendo el reclutamiento de leucocitos, la vasodilatación y vasoconstricción, así como el aumento de la permeabilidad vascular y activación de plaquetas (Chovatiya and Medzhitov 2014).

- Citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, etc) Se producen por muchos tipos de células pero principalmente por los macrófagos y los mastocitos. IL-1, IL-6 y el TNF- α son producidas por macrófagos activados y tienen en común la capacidad para estimular a los hepatocitos para producir proteínas de fase aguda (APP), como son la proteína C reactiva, α -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína amiloide sérica, etc. Estas moléculas actúan sobre el hipotálamo, induciendo la fiebre. Además, la IL-1 y el TNF- α activan las células endoteliales y suministran señales de coestimulación y mitogénesis a los linfocitos B y T. La IL-6 estimula la secreción de inmunoglobulinas y la proliferación de los linfocitos B (Chovatiya and Medzhitov 2014).
- Quimiocinas. Se producen por muchos tipos de células en respuesta a inductores de la inflamación. Controlan la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados (Medzhitov 2008).

- Enzimas proteolíticas (elastina, catepsinas y metaloproteinasas de la matriz). Estas moléculas tienen diversas funciones en la inflamación, incluyendo la defensa del huésped, la remodelación tisular y la migración de leucocitos (Medzhitov 2008).

1.2.2 Reacción inflamatoria.

La respuesta inflamatoria genera una gran acumulación de células inmunitarias en el sitio dañado, ya sea por estímulos internos o externos. Una de estas células son los macrófagos, los cuales además de su capacidad fagocítica, principalmente hacia patógenos, presenta una gran actividad como célula secretora, ya que libera una gran variedad de sustancias que participan en múltiples procesos biológicos, entre los que se encuentran el crecimiento celular y la citotoxicidad. Debido a la gran abundancia de este tipo celular, a su distribución, a su motilidad y capacidad de respuesta, los macrófagos pueden ser considerados pieza clave en la respuesta inmune e inflamatoria (Medzhitov 2007, Chovatiya and Medzhitov 2014).

En orden cronológico, la respuesta inflamatoria se basa, en primera instancia, en la activación de macrófagos para fagocitar y con esto eliminar a la fuente que inicio el proceso inflamatorio. En ocasiones la inflamación es persistente, lo cual desencadena una amplificación de la señal, implicando a otras células del sistema inmune y a la activación del sistema de complemento, que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), capaz de lisar a las células o microorganismos responsables de iniciar el proceso inflamatorio.

Se genera además una atracción de células inflamatorias a la zona afectada, fundamentalmente un mayor número de macrófagos, neutrófilos y otras células fagocitarias que desempeñan un papel clave en la respuesta antimicrobiana y tumoricida del sistema inmune, ya que generaran grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, entre los que se encuentran el óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O₂⁻), y peroxinitrito (ONOO⁻) con la finalidad de eliminar al agente que desencadenó el proceso inflamatorio (Freire and Van Dyke 2013, Chovatiya and Medzhitov 2014).

Por otro lado, las células endoteliales también participan en este proceso, regulando la extravasación de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia las zonas de inflamación. Primero llegan neutrófilos y, posteriormente, células mononucleares mediante la expresión en su superficie de moléculas de adhesión. La infiltración de las células inflamatorias sigue una secuencia temporal, donde participan, por un lado, las sustancias quimiotrópicas endógenas, como C5a, histamina y LT B; por otro lado, participan sustancias quimiotrópicas exógenas, como oligopéptidos iniciados con N-formil-metionina que las bacterias excretan. Ambos grupos de moléculas activan a las células endoteliales de los vasos que irrigan la zona inflamada, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, como la selectina P (Jones, Robb et al. 2016).

Componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), o citocinas como el TNF- α (procedentes de macrófagos que ya han llegado al foco inflamatorio) también activan el endotelio induciendo la expresión de selectina E (Freire and Van Dyke 2013). En la superficie de los neutrófilos y monocitos hay glicoproteínas que se unen

a estas selectinas, de modo que los leucocitos circulantes, al pasar por las zonas donde el endotelio se ha activado, se pegan a la pared del vaso y comienzan un proceso de movimiento llamado "rolling" a lo largo de la misma, sin separarse de ella. A su vez en la superficie de las células endoteliales existen otras moléculas de adhesión denominadas moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que presentan dos ligandos en la superficie leucocitaria, estos son: CD11a/CD18 (también llamado LFA-1) y CD11b/CD18 (el receptor de C3bi conocido como Mac-1). En condiciones normales, la interacción entre ICAM-1 y los ligandos es débil, pero bajo circunstancias inflamatorias, los leucocitos en fase de "rolling" que ya han sido afectados por las sustancias quimiotrópicas (C5a, histamina, leucotrieno B) liberadas en el foco inflamatorio, hacen que se produzca un cambio en la configuración de CD11a/CD18 y de CD11b/CD18 teniendo como consecuencia que su interacción con ICAM-1 sea lo suficientemente fuerte para detenerlos y fijarlos al endotelio (Medzhitov and Janeway 2000, Freire and Van Dyke 2013, Kotas and Medzhitov 2015). Los leucocitos atrapados por el endotelio activado ponen en juego otras interacciones entre moléculas de superficie y se abren paso entre las células endoteliales para salir del vaso sanguíneo (principalmente de los capilares), completando un proceso clásicamente conocido como diapédesis. Una vez fuera del vaso, los leucocitos se mueven a favor del gradiente de concentración de los mediadores quimiotácticos, dirigiéndose hacia el foco inflamatorio (Medzhitov and Janeway 2000).

1.2.3 El LPS como factor inductor del proceso inflamatorio por la vía de NF- κ B.

Los macrófagos juegan un papel modulador crucial en la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria, ya que contienen una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconoce organismos extraños con la finalidad de eliminarlos. Un ejemplo de estos receptores son los receptores tipo Toll (TLR), los cuales pueden ser activados por diferentes estímulos, entre los que destaca el LPS (Ip and Medzhitov 2015).

Para empezar la señalización el LPS se une a la proteína de unión al LPS (LBP), la cual cataliza el paso de los agregados de LPS y los transfiere al receptor CD14, que tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2). La MD-2 se asocia con el receptor TLR4. La unión del LPS a la porción externa del receptor TLR4 induce al dominio TIR (dominio citoplasmático con homología al dominio citoplasmático de IL1-R) al unirse y activa a MyD88 (gen de diferenciación mieloide de respuesta primaria). En un extremo MyD88 presenta un dominio TIR a través del cual interacciona con el dominio TIR de TLR4; en el otro extremo posee un dominio muerte (DD). MyD88, a través de este dominio de muerte, interacciona con IRAK (kinasa asociada a IL1-R), la cual inicia una cascada de activación de kinasas, activando IKK, el cual fosforila a I κ B que, en condiciones basales, secuestra al factor de transcripción NF- κ B, inactivándolo. Una vez en el núcleo activa la transcripción de genes que están implicados en la respuesta inflamatoria inducida por LPS (TNF- α , IL1 β , IL6 y COX-2). Por lo tanto, la activación del NF- κ B es un proceso fundamental en el desarrollo

de la inflamación (Medzhitov and Horng 2009, Tsukamoto, Fukudome et al. 2010, Buckley, Gilroy et al. 2013, Cho, Ryu et al. 2013).

1.2.3.1 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B).

NF- κ B es un factor de transcripción nuclear que está particularmente preparado para la defensa en aquellas condiciones que atenten contra la homeostasis de un sistema biológico, como son las infecciones virales y bacterianas, o por algún tipo de estrés físico (Lawrence and Fong 2010). En el tejido crónicamente inflamado, en el que los estímulos patogénicos externos parecen estar ausentes, TNF- α e IL-1 actúan como inductores endógenos primarios de NF- κ B. Cuando las células son expuestas tanto a estímulos externos, como es el caso del LPS, o estímulos internos, como TNF- α e IL-1, una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de sus inhibidores, por lo que NF- κ B es liberado para entrar en el núcleo y activar la expresión de genes. Estos complejos citoplasmáticos que son capaces de efectuar una translocación nuclear son conocidos como la familia de transcripción NF- κ B/Rel. Esta incluye a NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, y c-Rel. Muchos miembros de esta familia (con excepción de RelB) pueden homodimerizarse, así como formar heterodímeros entre ellos. La forma activada de NF- κ B que más prevalece es un heterodímero que consiste en la subunidad p50 y p65, la cual contiene dominios de transactivación necesarios para la inducción de genes (Lawrence and Fong 2010, Zheng, Lilo et al. 2011).

La expresión de proteínas de NF- κ B puede proveer especificidad por sitios y eventos en respuesta a estímulos particulares. Las proteínas p50 y p65 desempeñan un papel fundamental en la producción constitutiva de IL-6 en los fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide, mientras la activación de p65 por trombina regula la expresión de ICAM-1 en células endoteliales. Los heterodímeros p50 y p65 están íntimamente involucrados en la activación de genes proinflamatorios por IL-1 o TNF- α en monocitos humanos, y estos efectos son bloqueados por la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Kotas and Medzhitov 2015). Estas diferencias, junto a múltiples variaciones en los sitios de enlace semejantes a NF- κ B que interactúan con ciertos hetero y homodímeros NF- κ Bs, permiten a las células responder al ambiente externo en el tiempo apropiado y con los genes correctos.

NF- κ B existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada a proteínas reguladoras llamadas inhibidores de κ B (I κ B), de los cuales, los más importantes pueden ser I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ . La fosforilación de I κ B es un paso importante en la activación de NF- κ B, el cual está mediado por un complejo de proteínas cinasas llamado IKK. El complejo IKK contiene al menos tres subunidades, que incluyen las cinasas IKK α e IKK β (también llamadas IKK-1 e IKK-2, respectivamente), y la subunidad reguladora IKK- γ (NEMO). La activación de IKK inicia con la fosforilación de I κ B α en -NH₂ terminales específicos de residuos de serina. I κ B α fosforilado es entonces ubiquitinizado, convirtiéndose en un blanco para la degradación por el proteosoma 26S, liberando el dímero NF- κ B del complejo NF- κ B-I κ B citoplasmático y las proteínas NF- κ Bs se translocan al núcleo, donde se unen a elementos específicos en las regiones promotoras de los genes diana para activar así la

expresión génica. Posteriormente IKK también fosforila I κ B β e I κ B ϵ para su degradación (Lawrence and Fong 2010, Tsukamoto, Fukudome et al. 2010).

La activación de NF- κ B incrementa la expresión de moléculas de adhesión, E selectina, VCAM-1 e ICAM-1, mientras la inhibición de NF- κ B reduce la adhesión y trans migración de leucocitos. Sin embargo, este factor de transcripción participa en otros procesos biológicos, como en la inducción o inhibición de la apoptosis (Chovatiya and Medzhitov 2014).

NF- κ B es altamente activado en sitios de inflamación en diversas enfermedades y puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, quimiocinas, ICAM, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), COX-2 y activa a la iNOS. Por ejemplo, en artritis reumatoide, NF- κ B es sobre-expresado en la membrana sinovial inflamada y su actividad puede aumentar el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de mediadores proinflamatorios, tales como IL-1, IL-6, IL-8, y TNF- α . Para tratar este tipo de enfermedades inflamatorias, existe una amplia variedad de fármacos antiinflamatorios (Lawrence and Fong 2010).

1.2.4 Fisiopatología de la inflamación.

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune es esencial para combatir las infecciones y también participa en fenómenos inflamatorios. En algunos casos, además de frenar el crecimiento de microorganismos puede causar una respuesta tisular imprevista, la cual genera lesiones locales y/o generales. Esto se debe a diversas causas que pueden alterar o bloquear cualquiera de las etapas de este

proceso ordenado, lo cual puede derivar en procesos no deseados, como la infiltración tisular por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas) o la distorsión tisular mediante la biosíntesis incontrolada de colágeno (fibrosis o cirrosis) (Buckley, Gilroy et al. 2013). En otras circunstancias, la inflamación persistente puede provocar numerosas patologías, por ejemplo:

- **Enfermedades cardiovasculares:**

- Arteriosclerosis

- Tromboembolismo

- Enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica

- **Enfermedades respiratorias:**

- Asma

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

- **Enfermedades digestivas:**

- Enfermedad de Crohn

- Colitis ulcerosa

- Peritonitis

- **Enfermedades autoinmunes:**

- Esclerosis múltiple

- Artritis reumatoide

- **Otras enfermedades:**

- Obesidad

- Diabetes

Enfermedades neurodegenerativas

Cáncer (Huang, Wang et al. 2011, Park, Jin et al. 2011).

1.3 Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Existe una diversidad de modelos experimentales que se utilizan para el estudio de principios activos antiinflamatorios los cuales se pueden desarrollar tanto *in vivo* o *in vitro*. En la mayoría de los modelos *in vivo* se utilizan sustancias irritantes como el TPA (13-acetato de 1-12-O-tetradecanoilforbol), carragenina y aceite de croton, los cuales inducen un efecto inflamatorio local y favorecen el incremento de la enzima mieloperoxidasa (MPO) teniendo como resultado la generación de un edema. En estos modelos, la inhibición del edema refleja el efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa (Fucina, Rocha et al. 2016, Khan, Saraf et al. 2016). En los modelos *in vivo* se utilizan células fagocíticas, principalmente macrófagos, ya que estos responden a una variedad de estímulos de membrana (principalmente LPS), liberando diferentes mediadores proinflamatorios (citocinas, ROS y NOS), prostaglandinas, etc.); lo que se busca en este modelo es disminuir los mediadores proinflamatorios una vez que los macrófagos han sido estimulados con LPS y tratados con las sustancias a evaluar (Abiodun, Rodriguez-Nogales et al. 2016, Kwon 2016).

1.3.1 Modelo de edema en oreja inducido por TPA.

Se dispone de varios modelos *in vivo* para medir la actividad antiinflamatoria. Varían en la intensidad de la reacción y pueden ser de inflamación aguda, subcrónica o crónica.

Dentro de los modelos de inflamación aguda encontramos el modelo de edema auricular en ratón inducido por el TPA, que posee propiedades irritantes, produciendo una inflamación prolongada, intensa y bifásica en la epidermis (Theoduloz, Delporte et al. 2015, Siddiqui, Naqvi et al. 2016).

La primera fase está caracterizada por el edema de la dermis y el aumento de los niveles de TNF- α . Debido a su estereoquímica como análogo conformacional del diacilglicerol, el TPA desencadena varios eventos vinculados con la activación de la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio, lo cual lleva a la activación de la PLA2 y a la liberación de ácido araquidónico el cual es el precursor de las PG. Además activa factores de transcripción, como NF- κ B y AP1, que llevan a cabo la expresión de citocinas proinflamatorias (Garg, Ramchandani et al. 2008, Passos, Medeiros et al. 2013).

En la segunda fase se observa una inducción de la enzima COX-2. Se ha reportado que el TPA induce una respuesta inflamatoria de larga duración en comparación con el ácido araquidónico, asociada con la acumulación de macrófagos y de células PMN (basófilos, neutrófilos, eosinófilos) y la producción de eicosanoides tales como el receptor de LTB4 y la PGE2 bloqueada por AINEs e inhibidores de la 5-LO, con un aumento en la permeabilidad vascular e infiltración de neutrófilos. Así mismo se

observa un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa en los sitios de aplicación e inducción de la iNOS, entre otros eventos (Cervini-Silva, Nieto-Camacho et al. 2013, Castro, Ocampo et al. 2014)

Como resultado se desencadenan todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema. A nivel histológico, se produce: agregación plaquetaria, agregación y adherencia de compuestos PMN, migración a la dermis y desgranulación de mastocitos. A nivel bioquímico, en minutos y hasta varias horas después, se elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y las PGs E1, E2 y F2 (Huang, Wang et al. 2011, Park, Jin et al. 2011).

1.3.2 Modelo de estimulación de macrófagos con LPS.

Dado que las células fagocíticas, tales como los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y principalmente los macrófagos, responden a una variedad de estímulos de membrana son considerados importantes moduladores de la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Además, por su capacidad para sintetizar mediadores biológicos, como citocinas prostaglandinas y ROS, son muy utilizados como modelos de inflamación *in vitro*.

Éstos son estimulados con LPS, un fosfoglicolípido que se encuentra inmerso a la membrana bacteriana (lípidos A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico (esta región es la que confiere actividad biológica a la molécula). Éste a su vez comprende dos regiones: la cadena *O-específica* también llamada *antígeno O*, formada por unidades repetitivas de oligosacárido; y el *core*, que a su vez se

subdivide en *core externo* (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el *core interno* (formado por heptosas) (Brandenburg K 2016). El lípido A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico) (Tsukamoto, Fukudome et al. 2010).

Una vez que el LPS se une a sus receptores se inicia la cascada de señalización (como ya se describió en el apartado 1.2.3), que tiene como finalidad la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B y, con esto, llevar a cabo la transcripción de genes que están implicados en la respuesta inflamatoria, como TNF- α , IL1 β , IL6 y COX-2 (Palsson-McDermott and O'Neill 2004, Medzhitov and Horng 2009, Tsukamoto, Fukudome et al. 2010, Ip and Medzhitov 2015)

1.4 Tratamientos farmacológicos para la inflamación.

Las enfermedades inflamatorias se tratan con medicamentos antiinflamatorios convencionales, los cuales tienen su acción farmacológica principalmente bloqueando la acción de moléculas mediadoras de la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria. En la actualidad existen un gran número de fármacos empleados para tratar los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Éstos se clasifican en antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINES) (Cheekavolu and Muniappan 2016). Los antiinflamatorios más importantes son los glucocorticoides (cortisol, cortisona, prednisolona y dexametasona). Actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales son activados formando un complejo cortisol-receptor glucocorticoide, el cual interacciona con NF- κ B, y migran

al núcleo, induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria. También se sabe que tienen efectos post-transcripcionales y disminuyen la estabilidad de algunos ARNm proinflamatorios (Bak, Truong et al. 2013, Barnes 2016) Los efectos de estos esteroides son el resultado de la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas proinflamatorias, como IL-12, TNF- α y prostaglandinas (Hoppstadter, Hachenthal et al. 2016).

Los AINEs constituyen un grupo de sustancias químicamente heterogéneo que favorecen el aumento de permeabilidad vascular y la quimiotaxis de los neutrófilos en la reacción inflamatoria. Entre ellos encontramos al ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno, la indometacina, la dexametasona el peroxicam, el rofecoxib y el colecoxib, involucrados en el control terapéutico de la inflamación, con propiedades analgésicas y antipiréticas. Entre los medicamentos más utilizados está la indometacina, la cual es conocida como un agente antiinflamatorio no esteroideo con actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética (Lee, Kim et al. 2013, Kwon 2016). El mecanismo principal de estos medicamentos es la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, que inducen la síntesis de PG y TX; esto lo hacen compitiendo con el AA por el sitio activo. Cada AINE presenta un modo de inhibición, que se puede incluir dentro de tres modos de inhibición generales: (a) unión rápida y de forma reversible (ej. ibuprofeno, ácido mefenámico, ácido flufenámico, piroxicam, naproxeno); (b) unión reversible y rápida con baja afinidad seguida de unión, dependiente de tiempo, reversible y lenta (pseudoirreversible), produciendo un cambio conformacional en la proteína (ej. flurbiprofeno, indometacina,

diclofenaco, ácido meclofenámico) y (c) unión rápida y reversible seguida de modificación covalente (ej. unión de la aspirina por acetilación del residuo Ser530 (Andreas, Haupl et al. 2009, Wyns, Plessers et al. 2015, Woodward, Wang et al. 2016)

Existen AINEs selectivos para la COX-2 ya que algunos estudios muestran que COX-2 es la causante de los efectos proinflamatorios porque se expresa en células que participan en ésta, como macrófagos y monocitos. Por otro lado, se ha visto que la inhibición de la COX-1 produce lesión del conducto gastrointestinal, hemorragias en el estómago, disfunción plaquetaria y carece de efectos antiinflamatorios importantes. Los AINEs selectivos de COX-2 normalmente presentan en su estructura un grupo sulfonamida, metilsulfóxido o tioéter, que en la mayoría de los casos interaccionan con el residuo Arg 513 o Arg120 que se encuentran en el sitio hidrofóbico de COX-2, produciendo un cambio conformacional que tienen como resultado la inhibición de la enzima (Simpson, Luo et al. 2015, Liu, Moon et al. 2016, Thompson, Ashbeck et al. 2016)

La mayoría de los antiinflamatorios causan efectos adversos asociados al consumo por largos periodos. En el caso de los AINEs la mayoría los efectos adversos se deben a que no son selectivos de COX-2, los más comunes son: náuseas, dolor abdominal, pirosis, dispepsia, mareos, cefalea y somnolencia (Liu, Liu et al. 2012). Los efectos adversos de los antiinflamatorios esteroideos son más severos en comparación con los AINEs. Entre ellos encontramos efectos sobre la piel (la piel se deteriora o aparece acné), aumento de peso, un mayor riesgo de infecciones (debido a la disminución de la inmunidad), trastornos de la visión

(cataratas después de tratamientos largos y tomados durante varios meses o años), problemas digestivos (incluyendo úlceras), aparición o aumento de la hipertensión, descompensación psiquiátrica (hiperexcitación y depresión), entre otros (Huang, Wang et al. 2011, Bahl, Jachak et al. 2014). Debido a que el uso crónico de AINES trae como consecuencia efectos indeseables, la población que padece de enfermedades inflamatorias crónicas recurre a la medicina tradicional como alternativa para controlar la inflamación. Por esta razón las plantas medicinales presentan una fuente importante para la búsqueda de nuevos fármacos, los cuales puedan ser selectivos y con ello aminorar la aparición de efectos adversos.

1.5 Medicina tradicional utilizada en la inflamación.

Según la organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional es la suma de conocimientos, técnicas y prácticas, basadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.

Una planta medicinal se puede definir como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que son empleadas para el tratamiento tradicional de enfermedades. Actualmente se sabe que las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, y aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de las plantas medicinales, la OMS ha estimado que cerca del 65-80% de la población mundial recurre principalmente

a la medicina tradicional para la atención primaria de su salud, siendo la herbolaria una de las prácticas más recurrida (Cho, Ryu et al. 2013)

Actualmente se conocen un gran número de especies con actividad terapéutica. En México y otros países, éstas forman parte integral de la rica tradición de la cultura popular. En nuestro país existen cerca de 21600 especies de plantas vasculares, de las cuales más de 3350 son consideradas como plantas medicinales. Sin embargo, a pesar de su riqueza y variedad, sólo un pequeño porcentaje de las plantas medicinales mexicanas han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico. Además, la caracterización de los principios activos permite purificar los compuestos presentes en las plantas y descartar en los estudios con modelos *in vivo* o *in vitro*, aquellos que pudieran ser tóxicos o generar efectos adversos. En este sentido, los estudios de productos naturales con actividad antiinflamatoria están dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes que no presenten los efectos adversos mencionados anteriormente y a la producción de derivados sintéticos con actividad mejorada (Balunas and Kinghorn 2005, Gautam, Jachak et al. 2011).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Complejo matarique.

Algunas plantas medicinales se agrupan para su reconocimiento en complejos. Un complejo se define como un conjunto de especies de plantas que comparten nombres en común, características morfológicas y/o aromáticas, así como el uso terapéutico en la medicina tradicional (Linares and Bye 1987). El complejo permite explorar las bases etnobotánicas para entender cómo la gente reconoce aprovecha y maneja las plantas dependiendo de sus necesidades.

El complejo matarique lo conforman cinco especies de la familia Asteraceae nativas de México y Estados Unidos. Éstas son: *Psacalium decompositum*, *Psacalium sinuatum*, *Psacalium radulifolium* y *Psacalium peltatum*. Todas estas especies se utilizan principalmente como remedio para diabetes, pero también para reumatismo, enfermedades gastrointestinales y enfermedades del riñón. A pesar de que las cinco especies se utilizan para lo mismo, *Psacalium decompositum* es una de las más importantes ya que además de utilizarse en su ámbito natural, también se comercializa en mercados a distancia y es considerada como la especie más efectiva del complejo en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente (Linares and Bye 1987).

2.1.1 *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell.

Psacalium decompositum (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae) es una planta terrestre, silvestre que habita principalmente en la Sierra Madre Occidental y en el

centro del país en un clima semiseco, entre 1950 y los 2050 m. s.n.m. donde se distribuye en zonas montañosas, comúnmente llamado “matarique”, llega a medir entre 30 cm a 1.6 m de altura . Su inflorescencia posee de 10 a 24 flores, con péndulos de hasta 2 cm de largo. Las flores son hermafroditas, corola simpétala, de color crema a café, posee un rizoma fibroso y grueso (Linares and Bye 1987).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Psacalium*

Especie: *Psacalium decompositum* (Gray) H.E. Robins & Brettell

Nombre común: Matarique

Sinonimia: *Cacalia decomposita* A. Gray, *Mesadenia decomposita* (A. Gray),
Odontotric decompositum (A. Gray) Rydberg

Tradicionalmente el té de sus raíces se utiliza para el tratamiento de la diabetes, cicatrización de heridas, dolores, reumatismo, cólico renal, estreñimiento, neuralgias, enfermedades gastrointestinales y úlceras. Además, las raíces

machacadas se utilizan en mordeduras de víbora y la infusión de las raíces como antiséptico en heridas (Mendoza-Cruz 2009).

Estudios fitoquímicos de las raíces de *P. decompositum* permitieron la identificación de los sesquiterpenos cacalol, cacalona, maturina y maturona, los compuestos mayoritarios presentes en el extracto hexánico (Correa 1966).



Figura 1. A) Hojas, B) Flores y C) Raíces de *Psacalium decompositum* (Alexander, 2006).

2.1.2 Pruebas biológicas y compuestos aislados de *Psacalium decompositum*.

De las primeras pruebas biológicas que se realizaron con *Psacalium decompositum* se logró comprobar su actividad fungicida y antimicrobiana. Para corroborar su actividad fúngica se utilizó el extracto acuoso de las raíces, el cual presentó actividad contra hongos fitopatogénos, principalmente contra *Alternaria*, *Pythium*, *Fusarium* y *Helminthosporium*, siendo un herbicida y fungicida selectivo natural (Anaya, Hernandez-Bautista et al. 1996).

Para observar su actividad antimicrobiana se utilizaron extractos metanólico, hexánico y de acetato de etilo de las raíz por el método de antibiograma, encontrando que los extractos tiene efectos sobre bacterias como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Jiménez-Estada 1992).

Con respecto a los estudios dirigidos para determinar los constituyentes químicos de las raíces de *Psacalium decompositum* se han utilizado extractos desde los más polares como el extracto acuoso hasta los menos polares como es el extracto con éter de petróleo. Del extracto hexánico se han aislado y caracterizado más de diez compuestos, siendo el cacalol, la cacalona, la maturina, la maturinona y la maturona los sesquiterpenos más abundantes (Figura 2) (Romo y Joseph-Nathan,1964, Correa y Romo, 1966)

A pesar de que los compuestos anteriormente mencionados son los más abundantes a principios de los años 90 Jiménez-Estrada y cols. publicaron los primeros trabajos sobre la acción de los compuestos anteriormente mencionados, en donde se reconoció que de todos estos compuestos, el cacalol era uno de los más activos (Anaya, Hernandez-Bautista et al. 1996). Entre sus propiedades biológicas se ha demostrado actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aerous*, y *Streptococcus pyogenes* (Jiménez-Estrada, 1992); actividad antihiper glucemiante utilizando ratones de la cepa C57BL-6J (Inman et al., 1999); produjo inhibición significativa en el crecimiento radial de hongos fitopatógenos de *Alternaria* y *Fusarium* (Anaya, Hernandez-Bautista et al. 1996); también mostró gran actividad antioxidante en el modelo de

homogenizado de cerebro de rata, además de actuar como un potente neuroprotector (Shido et al., 2004); inhibe canales de potasio dependientes de ATP en aorta de rata estimuladas con diazóxido (Campos, Oropeza et al. 2009); y presenta actividad antiinflamatoria en el modelo de edema subplantar, inducido por carragenina y el en modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA (Jimenez-Estrada, Chilpa et al. 2006).

Otro de los extractos estudiados es el extracto acuoso, del cual en el 2011 Jiménez y cols. reportaron una fracción acuosa rica en polisacáridos de tipo fructano (siete unidades de fructosa y una de glucosa) (Figura 3), la cual presentó efecto hipoglucemiante en ratones sanos y con diabetes inducida por aloxana (Jimenez-Estrada, Merino-Aguilar et al. 2011).

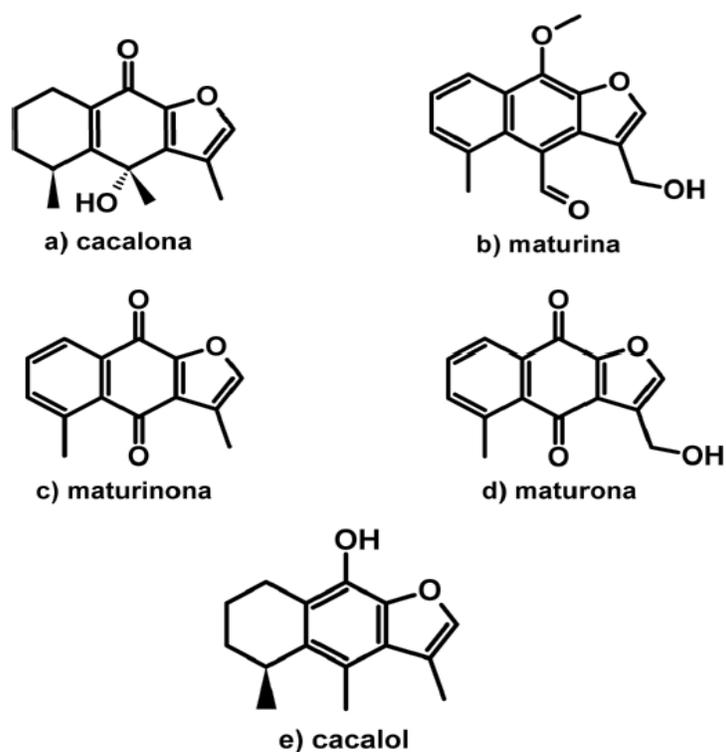


Figura 2. Sesquiterpenos mayoritarios aislados de las raíces de *Psacalium decompositum*.

En los últimos años los estudios de *Psacalium decompositum* han estado dirigidos a su efecto hipoglucemiante. Las propiedades hipoglucemiantes de esta planta han sido ampliamente estudiados, ya que extractos y fracciones son eficaces en la reducción de los niveles de glucosa en ratones normoglucémicos y ligeramente diabéticos, así como en conejos temporalmente hiperglucémicos, pero no en animales severamente diabéticos (Alarcon-Aguilar et al. 1997; Alarcon-Aguilar et al. 2000)

Mientras que las propiedades antimicrobianas, fungicidas e hipoglucemiantes de las raíces de *Psacalium decompositum* han sido ampliamente estudiadas, no ha sido así para sus potenciales propiedades antiinflamatorias, las cuales no han sido investigadas con profundidad. Sólo existe un reporte *in vivo* donde el extracto hexánico de *Psacalium decompositum* fue probado en dos modelos de inflamación (edema subplantar inducida por carragenina y edema auricular inducido por TPA) observándose una clara inhibición del edema inducido por carragenina y TPA. Por otra parte, la fracción FOS no se ha probado en modelo de inflamación, pero se ha reportado que en un modelo de síndrome metabólico disminuyó los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β). Sin embargo, aún no se describe el mecanismo por el cual *Psacalium decompositum* ejerce efecto antiinflamatorio.

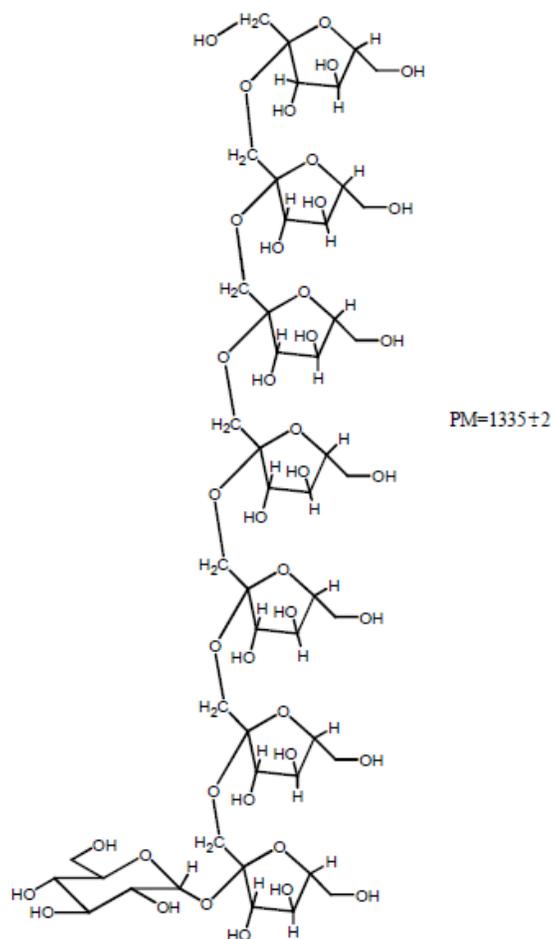


Figura 3. Estructura de la fructana, compuesto aislado de las raíces de *Psacalium decompositum*.

3. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades caracterizadas por un proceso inflamatorio conllevan un gran impacto económico, social y en la calidad de vida de quienes las padecen. Desafortunadamente los agentes antiinflamatorios de uso clínico que se utilizan para el tratamiento de la inflamación pueden presentar diferentes efectos adversos, es por eso que se buscan nuevos compuestos antiinflamatorios que no produzcan estos efectos. En México, la información etnobotánica indica una gran variedad de plantas medicinales que se utilizan para tratar la inflamación y los síntomas relacionados con este proceso, es por eso que las plantas medicinales son una fuente potencial para el descubrimiento de dichos compuestos permitiendo así validar su uso en la medicina tradicional. Una de estas plantas es *Psacalium decompositum* comúnmente llamada “matarique”, la cual se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes mellitus, dolores, reumatismo, enfermedades hepáticas, cólico renal, enfermedades gastrointestinales, neuralgia y úlceras (Linares E. 1987). De esta planta con potencial antiinflamatorio ya se han aislados diversos compuestos sesquiterpénicos como es el cacalol y el acetato de cacalol, así como una fracción rica en fructooligosacáridos los cuales en estudios previos han demostrado tener efecto antiinflamatorio en modelos de inflamación. (Jimenez-Estrada, Chilpa et al. 2006, Merino-Aguilar, Arrieta-Baez et al. 2014). Se ha reportado que diferentes moléculas derivadas de plantas, como los diterpenoides, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, glucósidos y polifenoles tienen actividad antiinflamatoria, ya que algunos de ellos suprimen mediadores inflamatorios o funcionan como inhibidores de NF- κ B. En este sentido, las plantas

medicinales, en especial *Psacalium decompositum*, representa una fuente potencial de compuestos terpénicos y glucósidos con efecto antiinflamatorio, de los cuales no se conoce cómo afectan la producción de citocinas (TNF- α , IL-6, IL- β e IL-10). Es por eso que este estudio es una aproximación al conocimiento del mecanismo antiinflamatorio de esta planta usada en la medicina tradicional mexicana.

4. HIPÓTESIS.

Si el cacalol, acetato de cacalol y la fracción rica de fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum* tienen actividad antiinflamatoria, se observarán decrementos en citocinas proinflamatorias e incrementos en citocinas antiinflamatorias, así como disminución en la activación de NF- κ B.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antiinflamatoria del cacalol, acetato de cacalol y la fracción rica en fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum* en macrófagos RAW 264.7.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Corroborar el efecto antiinflamatorio del cacalol, acetato de cacalol y la fracción de fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum* en un modelo de inflamación aguda.
- Evaluar la producción de citocinas (IL-6, TNF- α , IL1 β , IL-10) en cultivo de macrófagos tratados con cacalol, acetato de cacalol y la fracción de fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum*.
- Determinar la acción del cacalol, acetato de cacalol y la fracción de fructooligosacáridos de *Psacalium decompositum* sobre la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y NF-kB en macrófagos en cultivo.

7. MATERIAL Y MÉTODO.

7.1 Material vegetal.

Las raíces de la planta fueron proporcionadas por el Dr. Jiménez Estrada del Instituto de Química de la UNAM, las cuales fueron colectadas en la localidad de Norogachi, ubicada en el municipio de Guachochi, Chih., siendo sus coordenadas geográficas 27°16'25" latitud norte, 107°07'56" longitud oeste y una altitud de 2,131 m s.n.m. La identificación taxonómica de la planta fue determinada empleando claves taxonómicas y comparándola con ejemplares localizados en el herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (Herbario IMSSM, No. 11489).

7.2 Obtención de los extractos de la raíz de *Psacalium decompositum*.

La raíz de *P. decompositum* (500 g) se secó y se fragmentó para posteriormente macerarla a temperatura ambiente con hexano (4 L/24 h/5 veces) con el fin de extraer los compuestos menos polares (sesquiterpenos), todo esto en una campana de flujo laminar. El monitoreo de las maceraciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas cromatografías recubiertas de gel sílice 60 (ALUGRAM SIL G/UV₂₆₄ MACHEREY-NAGEL) de 0.20 mm de espesor, se visualizaron con luz UV con longitud de onda 254 nm y 356 nm y se revelaron por aspersion con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, seguido de un calentamiento hasta visualizar los compuestos.

Al material vegetal residual se le agregó agua a temperatura ambiente (5 L/24 h/5 veces) para extraer los compuestos polares (fructooligosacáridos). El agua y el hexano se dejaron evaporar a la temperatura del laboratorio en recipientes de superficie amplia durante una semana. Cuando el extracto ya se encontraba seco se recuperó y se calculó el rendimiento del extracto para realizar posteriormente el análisis fitoquímico y con ello la extracción de los sesquiterpenos y los fructooligosacáridos.

7.2.1 Obtención de cacalol.

Se tomaron 3.5 g del extracto hexánico y se disolvieron en 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), se le añadieron 3 g de gel sílice y se eliminó el disolvente con agitación contante hasta que se obtuvo un polvo y posteriormente se separó por cromatografía de columna abierta (CCA).

La columna se empacó utilizando 30 g de gel de sílice (previamente mezclada con hexano) con un tamaño de malla de 70-230 como fase estacionaria, en una columna de vidrio, con capacidad de 500 mL y 3.5 cm de diámetro. Una vez empacada la columna se le agregó el extracto mezclado con el gel sílice formando una capa uniforme. Se colectaron fracciones de 150 mL cada una, empleando como fase móvil un sistema de elución Hexano:Acetato de etilo (Hx:AcOEt) (8:2). El fraccionamiento fue monitoreado por CCF, reuniendo las fracciones que presentaban componentes similares. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor.

7.2.2 Obtención del acetato de cacalol.

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 3.5 g del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*, se le añadieron 4 mL de piridina anhidra y 5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por 48 horas a temperatura ambiente.

A la mezcla de reacción, se le añadieron 50 mL de agua y 50 mL de acetato de etilo. El contenido del matraz se trasvasó a un embudo de separación y se le añadieron 20 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10%. La fase acuosa se llevó a pH neutro con una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 10 %. Se recuperó la fase orgánica y se le agregó sulfato de sodio (Na_2SO_4) para eliminar los residuos de agua, se filtró y se concentró a presión reducida.

El producto de la reacción de acetilación se separó mediante CCA. Se tomaron 3 g del extracto hexánico sometido a la reacción de acetilación, se disolvieron en 5 mL de CH_2Cl_2 , se le añadieron 3 g de gel sílice y se eliminó el disolvente con agitación constante hasta que se obtuvo un polvo.

La columna se empacó utilizando 30 g de gel de sílice (previamente mezclada con hexano) con un tamaño de malla de 70-230 como fase estacionaria, en una columna de vidrio, con capacidad de 500 mL y 3.5 cm de diámetro. Una vez empacada la columna se le agregó el extracto mezclado con el gel sílice formando una capa uniforme. Se colectaron fracciones de 150 mL cada una, empleando como fase móvil un sistema de elución Hx:AcOEt (8:2). El fraccionamiento fue monitoreado por CCF, reuniendo las fracciones que presentaban componentes similares. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor.

7.2.3 Obtención de la fracción de fructooligosacáridos.

Del extracto acuoso se obtuvo un residuo sólido amorfo, con una coloración café oscura y un olor característico. El rendimiento del extracto fue de 155 g que equivale al 35% de peso seco.

El extracto resultante se maceró con MeOH (200 mL/1 h/10 veces), con el propósito de extraer los compuestos de baja y mediana polaridad y dejar en la parte soluble en agua solo los compuestos polares y de ahí obtener la fracción rica en polisacáridos (FOS).

Posteriormente la fracción FOS (10 mg) se disolvió en D₂O (óxido de deuterio) y se analizaron en un espectrómetro Varian Gemini operando a 500 MHz para ¹H. Los desplazamientos químicos se indican en unidades δ (ppm) y se compararon con los descritos anteriormente (Jimenez-Estrada, Merino-Aguilar et al. 2011).

Fracción FOS: ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 5.48 ppm (J = 3.3 Hz), 4.26 (1H, d, J = 8.2) and at 4.12 (1H t, J = 8.7, J = 8.2), 3.86 (H₅, s), 3.76 (H_{6a}, m) and 3.83 (H_{6b}, bs), 3.82 (1H, dg, J = 10 Hz), 3.71 ppm (1H, dg, J = 10 Hz), 3.56 (1H), 3.84 (1H, m), 3.76 ppm (1H, m). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 93.23 (C-1), 104.05 (C-2), 81.92 (CH-5), 77.90 (CH-3), 75.20 (CH-4), 62.87 (CH₂-6), 61.80 (CH₂-1).

7.3 Modelo de evaluación antiinflamatoria *in vivo*.

7.3.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones machos, sanos, cepa CD-1, aproximadamente de seis semanas de edad, de 25 a 30 g de peso. Los cuáles fueron proporcionados por el

bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I), en el cual se criaron y mantuvieron bajo condiciones de temperatura, ambiente y ciclos de luz-oscuridad 12X12 horas, y con suministro de agua y alimento (Harlan®) *ad libitum*. El manejo de los animales de laboratorio se llevó a cabo de acuerdo con los estatutos del CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) basados en las normas internacionales y nacionales establecidas en la "Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de la animales de laboratorio" [NOM-062-ZOO-1999].

7.3.2 Edema auricular inducido con TPA.

Los animales fueron separados en cuatro grupos de 5 animales, el edema se indujo con TPA (Sigma Aldrich), el cual se aplicará tópicamente en la oreja izquierda del ratón a una dosis de 2.5 µg de TPA/oreja, disueltos en 25 µL de acetona (vehículo); en la oreja derecha se administraron 25 µL de acetona. En todos los casos, después de 30 minutos de la aplicación del TPA, se administró tópicamente 1 mg de extracto hexánico, acuoso, fracción de fructooligosacáridos, cacalol, acetato de cacalol y acetato de maturina en ambas caras de la oreja tratada con TPA disueltos en 25 µL del disolvente (metanol o agua). La indometacina (2 mg/oreja, Sigma Aldrich) se administró de la misma manera como control positivo; y un grupo sólo será tratado con TPA, el cual será el control negativo. Los animales serán sacrificados por dislocación cervical 6 h después de la aplicación del TPA, realizando una perforación de 6 mm de diámetro del tejido atrial del centro del pabellón auricular con un sacabocados, en ambas orejas; se registró el peso del tejido auricular. El

edema inducido se cuantificó en relación con la diferencia del peso entre el tejido auricular que recibió TPA y el tejido que recibió únicamente vehículo (Jimenez-Estrada, Chilpa et al. 2006).

La inhibición del edema se determinó como porcentaje respecto al edema formado en los animales del grupo control, con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(W - W_o) - (W' - W_o')}{(W - W_o)} \times 100$$

Donde:

W = Peso de la oreja con TPA (Control)

W_o = Peso de la oreja con vehículo (Control)

W' = Peso de la oreja con TPA (+ o C.S.V.)

W_o' = Peso de la oreja con vehículo (+ o C.S.V.)

7.4 Modelo *in vitro*.

7.4.1 Línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón.

La línea celular RAW 264.7 fue adquirida de American Type Culture Collection (ATTC, Rockville, MD.). Las células fueron cultivadas a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)(GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino. El medio de cultivo se complementó con 1000 U/ml de gentamicina, 0.2 mM de piruvato y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Microlab). Para resembrarlas se utilizó tripsina 0.025% en PBS-EDTA 2 nM y se sembraron en botellas de plástico estériles de 75 mm² (Corning, Acton,

MA, EUA); se esperó hasta que llegaron a confluencia y posteriormente se sembraron en placas de 6 pozos. Una vez que éstas estaban en confluencia se iniciaron los tratamientos(Cho, So et al. 2014).

7.4.2 Viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de MTT reportada por Mosman (1983), que se basa en la capacidad de la deshidrogenasa de la célula para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua (color amarillo), a formazán (color azul) insoluble en agua. Se sembraron 5000 células/pozo en placa de 96 pozos con medio D-MEM y se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ durante una noche. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS y posteriormente se le agregó medio de cultivo nuevo con determinadas concentraciones de los extractos o compuestos aislados. En el caso de los extractos hexánico y acuoso, así como la fracción rica en fructooligosacáridos de *P. decompositum*, se utilizaron concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml; para los compuestos aislados, cacalol y acetato de cacalol, se utilizaron concentraciones de 10, 100 y 200 µM y para nuestro control dexametasona se utilizaron concentraciones de 25 y 50 µM durante 24 h. Pasadas las 24 h se retiró el medio y se agregó una solución de 0.1 mg/mL de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se les retiró el medio y se le agregó 200 µL d una solución de HCl 0.04 M en 2-isopropanol durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de ELISA. La funcionalidad se determinó por el porcentaje del cambio de extinción de MTT.

7.4.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10).

Para determinar la concentración de citocinas se usó la técnica de ELISA. Se basa en un inmunoensayo tipo sandwich con anticuerpos monoclonales específicos para las citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10), inmovilizados en una microplaca de 96 pozos en una fase sólida que contiene controles estándares. Para esto, las células RAW 264.7 fueron sembradas en placas de 6 pozos, se estimularon con 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS durante 60 min y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, transcurridos los 60 minutos se trataron con los extracto hexánico, acuoso, cacalol, acetato de cacalol y la fracción FOS y se dejaron incubar 30, 60, 120 y 180 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se colectó el medio D-MEN de las células con cada uno de los tratamientos y a los diferentes tiempos y se colocaron en los pozos apropiados con una enzima peroxidasa de rábano y un anticuerpo monoclonal marcado (conjugado). La molécula de la citocina se quedó intercalada entre la fase sólida y el conjugado. Después se incubaron por 2 h en un agitador mecánico a temperatura ambiente, los pozos de la microplaca se lavaron con buffer de lavado para eliminar el conjugado no unido. Posteriormente se adicionó a cada pozo el sustrato proporcionado por el proveedor, incubando nuevamente la microplaca en un agitador mecánico a temperatura ambiente por 15 min. Durante este tiempo el sustrato reacciona con el conjugado unido en los pozos. Después del tiempo de incubación se detuvo la reacción, añadiendo una solución de paro, cambiando el color de azul a amarillo. Finalmente se midió la densidad óptica por lector de

microplacas a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Esto se hizo para cuantificar cada una de las diferentes citocinas.

7.4.4 Análisis de la transcripción génica de citocinas inflamatorias.

7.4.4.1 Extracción de ARN total.

Para la extracción de ARN total en las células RAW264.7 se empleó la técnica descrita por Chomczynski (1993). Para cuantificar la expresión de los genes de IL-6, TNF- α , IL1 β e IL-10 se sembraron 1×10^6 células en una botella para su proliferación. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y resembradas en placas de 6 pozos, se estimularon con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durante 60 min, transcurridos éstos se trataron con los extractos hexánico y acuoso de *P. decompositum* a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, la fracción FOS a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ y para el cacalol y acetato de cacalol a una concentración de 100 μM , todos los tratamientos se aplicaron por 15, 30, 60, 90 y 240 minutos (Se hicieron 4 repeticiones con una $n=5$ casa repetición) Posteriormente se colectó el medio de cultivo y fueron lavadas con PBS. Se agregó 1 mL de Trizol[®] y se desprendieron de la placa con un gendarme de goma estéril. El homogenizado se depositó en tubos Ependorff en donde se les dejó reposar en hielo. Posteriormente se agregaron 0.3 mL de cloroformo y agitó el tubo durante 20 seg. Las muestras se centrifugaron a 11700 g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (fase incolora) y se le agregó 0.5 mL de isopropanol, dejando reposar por 25 min en hielo. Después se centrifugo a 11700 g durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con un 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 11700

g durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado (ARN total) obtenido se secó al vacío. El botón de ARN se suspendió en una solución de dietilpircarbonato (DEPC) al 0.15 o agua libre de RNAsas. Se observó la integridad del ARN total mediante un gel de agarosa al 1%. Finalmente se cuantificó por espectrofotometría mediante NanoDrop® a una absorbancia de 260 nm.

7.4.4.2 Cuantificación de la expresión del ARNm de IL-6, TNF- α , IL1 β e IL-10.

Transcripción en Reversa acoplado a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.

El DNAc se sintetizó a partir de 2 μ g de ARN total por PCR utilizando la transcriptasa reversa ImProm II, también se utilizaron iniciadores alzar (ramdon primers 0.5 μ g/ μ L). El volumen total de reacción (20 μ g) se incubó con la siguiente secuencia de ciclos: inicio 25 °C por 5 minutos, seguido de la extensión a 42°C por 55 minutos y por último se detuvo la reacción inactivando la enzima a 70°C por 15 minutos y enfriando a 4°C por 5 minutos

El cDNA se amplificó mediante la enzima ADN polimerasa del kit de “ADN master plus SYBR Green 1” para los genes de IL-6, TNF- α , IL1 β , IL-10 y 36B4 como gen de referencia (Tabla1). El proceso se llevó utilizando SYBR Green con el equipo Rotor Gene, La mezcla de reacción con un volumen fina de 10 μ L que contenía 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes de IL-6, TNF- α , IL1 β e IL-10, usando 36B4 como gen de referencia y la mezcla 1X que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 Mm.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en la qPCR.

PRIMER	SECUENCIA	GenBank
TNF-α	F5'-CCTCCCTGTCA TCAGTTCTA-3'	NM_013693.1
	R5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	
IL-6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'	NM_000071.1
	R5'-CAGAAT TGCCATTGCACAAC-3'	
IL-1β	F5'-TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT-3'	NM_000068.7
	R5'-GTCACAGAGGACGGGCTCTT-3'	
IL-10	F5'-CAGAGCCACATGCT-3'	NM_000067.6
	R5'-GTCCAGCCTGGTCCT-3'	
COX-2	F5'-CAACACCTGAGCGGTTACC-3'	NM_011198.4
	R5'-CAGAGGCAATGCGGTTCTGAT-3'	
36B4	F5'-AAGCGC GTCCTGGCATTGTCT-3'	NM_007475.2
	R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTG GT-3'	

7.4.5 Activación de NF- κ B.

En el caso de la actividad de NF- κ B se utilizaron células RAW 264.7, fueron sembradas en placas de 6 pozos, se estimularon con 5 μ g/mL de LPS durante 60 minutos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, transcurridos los 60 minutos se trataron con los extracto hexánico, acuoso, cacalol, acetato de cacalol y la fracción FOS y se dejarán incubar por 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Las concentraciones de NF- κ B total y de la subunidad p65 fosforilada se determinaron por medio de la técnica de ELISA. Todo se realizó por cinco pozos en cada muestra, realizándolo por triplicado.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresan como media \pm el error estándar de la media (E.E.M.).

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto del control y posteriormente se les aplicó la prueba paramétrica complementaria de Tukey-Kramer con una $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS.

9.1 Análisis fitoquímico.

9.1.1 Obtención del cacalol.

Después de cinco extracciones con hexano, se obtuvieron 15 g de residuo del extracto hexánico a partir de 500 g de raíces secas de *P. decompositum*, lo que correspondió a 3% de rendimiento en peso seco.

De este residuo, 3 g fueron separados por CCA usando como sistema de elución HX:AcOEt de forma creciente. Se obtuvieron 40 fracciones, de las cuales, de la fracción 3 a la 17 presentaron cacalol, el cual no cristalizó debido a impurezas. Se realizó entonces una placa preparativa para obtener el compuesto puro, obteniéndose 120 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 91-92°C y un Rf de 0.51 en un sistema de elución Hx:AcOEt (8:2), lo cual coincide con lo reportado por (Manuel Jiménez-Estrada 2012).

El compuesto aislado se identificó mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , en cuyos espectros se observó una señal desplazada a 5.12 ppm correspondiente al hidrógeno del grupo OH, a 7.22 ppm se distingue la señal perteneciente al hidrógeno unido al C-12, a 2.56 ppm la señal para los hidrógenos unidos al C-14 correspondientes al metilo unido al grupo fenol y a 2.36 ppm se observan los protones unidos al C-13 perteneciente al metilo unido al furano.

En el espectro de infrarrojo se observa una banda característica del grupo OH en 3495 cm^{-1} , que corresponde al fenol de la estructura del cacalol.

9.1.2 Obtención del acetato de cacalol.

Se procedió a realizar una reacción de acetilación del cacalol para obtener el acetato de cacalol. Esto con la finalidad de proteger al grupo fenólico ya que éste se oxida fácilmente. La reacción se llevó a cabo directamente sobre el residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*. El acetato de cacalol se separó mediante CCA. Se colectaron 90 fracciones utilizando Hx:AcOEt (8:2) como fase móvil. De la fracción 75 a la 83 se obtuvo el acetato de cacalol.

A partir de 3 g del residuo del extracto hexánico acetilado se obtuvieron 210 mg de acetato de cacalol, que correspondieron al 5.2% de rendimiento del peso del residuo acetilado. El acetato de cacalol se presentó como un sólido beige, con un punto de fusión de 105-106°C y un RF de 0.63 en HxOEt (8:2), el cual coincide con lo reportado (Manuel Jiménez-Estrada 2012)

Mediante el espectro de RMN ¹H se corroboró la identidad del acetato de cacalol, en donde ya no se observa la señal correspondiente al hidrógeno del grupo hidroxilo del grupo fenol del cacalol; se siguen observando las señales pertenecientes a los hidrógenos correspondiente a los metilos en las posiciones 15, 13 y 14, cuyos desplazamientos son 1.21, 2.39 y 2.59 ppm, respectivamente; también se sigue observando la señal del hidrógeno del grupo furano a 7.22 ppm. Adicionalmente se observan los protones del metilo del grupo acetato, lo cual corroboró la acetilación del cacalol.

En el espectro infrarrojo se observó una banda en 1764 cm^{-1} que corresponde a la vibración C=O del grupo carbonilo del acetato, además que desapareció la banda de 3495 cm^{-1} , perteneciente al grupo hidroxilo del fenol.

9.2 Evaluación *in vivo* e *in vitro*.

9.2.1 Efecto anti-inflamatorio en el modelo de edema auricular.

En las tablas 2 y 3 se muestran los datos obtenidos de la evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto hexánico y acuoso, así como de los compuestos aislados de *P. decompositum* en el modelo de edema auricular inducido con TPA. Las orejas tratadas sólo con el vehículo (orejas derechas), exhibieron un peso de 9.37 ± 0.29 mg (estas orejas no desarrollaron edema). Las orejas que recibieron sólo TPA/vehículo (grupo control) desarrollaron un edema, 6 horas después de la aplicación del TPA, de 16.62 ± 0.8 mg. Las orejas tratadas con dexametasona mostraron un edema significativamente menor en comparación con el grupo control; su porcentaje de inhibición fue de 51.2%. Los grupos tratados con cacalol y acetato de cacalol presentaron un porcentaje mayor al 40%, el extracto acuoso no presentó inhibición del edema, pero la fracción FOS lo inhibió en 27.8%.

Tabla 2. Actividad anti-inflamatoria del extracto hexánico y compuestos aislados de *P. decompositum* en modelo de TPA.

GRUPO	DOSIS	PESO DE LA OREJA (mg) ± M.E.S.	% DE INHIBICIÓN
TPA+ CHCl ₃	2,5 µg/oreja	16.62 ± 0.8	-
Extracto hexánico	1 mg/oreja	10.1 ± 1.0	39.2 *
Cacalol	1 mg/oreja	9.2 ± 0.8	45.5 *
Acetato de cacalol	1 mg/oreja	9.9 ± 0.9	40.3 *
Dexametasona	0.5 mg/oreja	8.1 ± 0.4	51.2 *

Media ± E.E.M. (n=5) ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.
*Diferencias significativas comparadas con el Control-TPA (*p<0.05).

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria del extracto acuoso y la fracción de fructooligosacáridos de *P. decompositum* en modelo de TPA.

GRUPO	DOSIS	PESO DE LA OREJA (mg) ± M.E.S.	% DE INHIBICIÓN
TPA+ H ₂ O:C ₃ H ₆ O 1:1	2.5 µg/oreja	16.1 ± 0.7	-
Extracto acuoso	1 mg/oreja	15.4 ± 0.2	8.6
FOS	1 mg/oreja	11.6 ± 0.8	27.8 *
Dexametasona	0.5 mg/oreja	8.3 ± 0.4	48.3 *

Media ± E.E.M. (n=5) ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.
*Diferencias significativas comparadas con el Control-TPA (*p<0.05).

9.2.2 Prueba de funcionalidad celular en las células RAW 264.7 por MTT.

Las células tratadas con los extracto hexánico y acuoso de *P. decompositum* mantuvieron una funcionalidad mayor al 99% a una concentración de 10 µg/mL. En el caso de la fracción FOS el mayor porcentaje de funcionalidad se observó a una concentración de 1 µg/mL. En el caso de los compuestos se utilizaron concentraciones de 10, 100 y 200 µM, y para los tres compuestos la concentración de 100 µM fue la que presentó un porcentaje mayor al 100%. Las concentraciones elegidas para los tratamientos posteriores fue de 10 µg/mL para los extractos, de 1 µg/mL en la fracción FOS (Figura 4) y de 100 µM para los compuestos (cacalol y acetato de cacalol) (Figura 5), ya que al ser utilizadas estas concentraciones se mantiene un porcentaje de funcionalidad mayor al 95%, el cual figura en el rango de aceptación de la prueba de funcionalidad celular según la literatura.

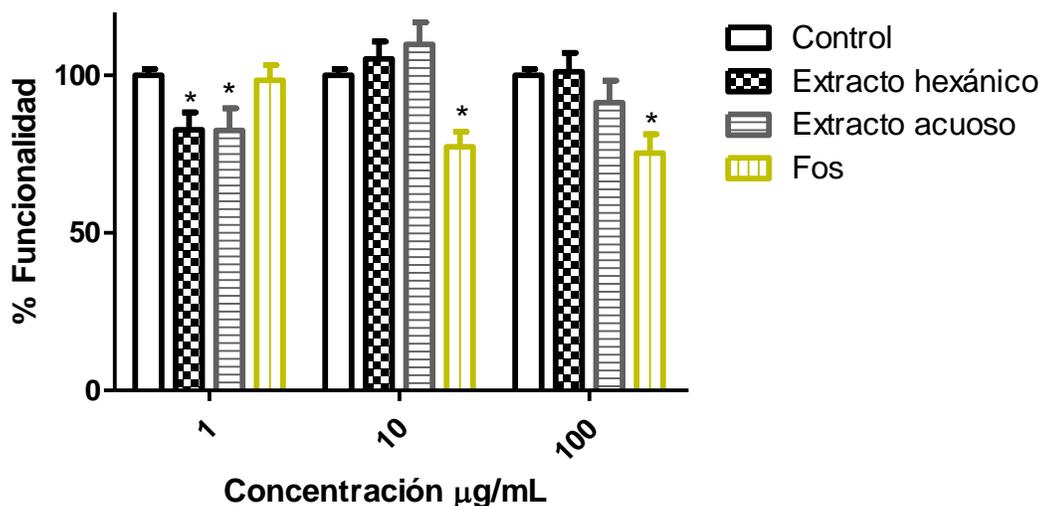


Figura 4. Funcionalidad de las deshidrogenasas en células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de los extractos hexánico y acuoso, así como la fracción de fructooligosacáridos de *P. decompositum* (n=20); *Diferencia significativa respecto al control (p< 0.05).

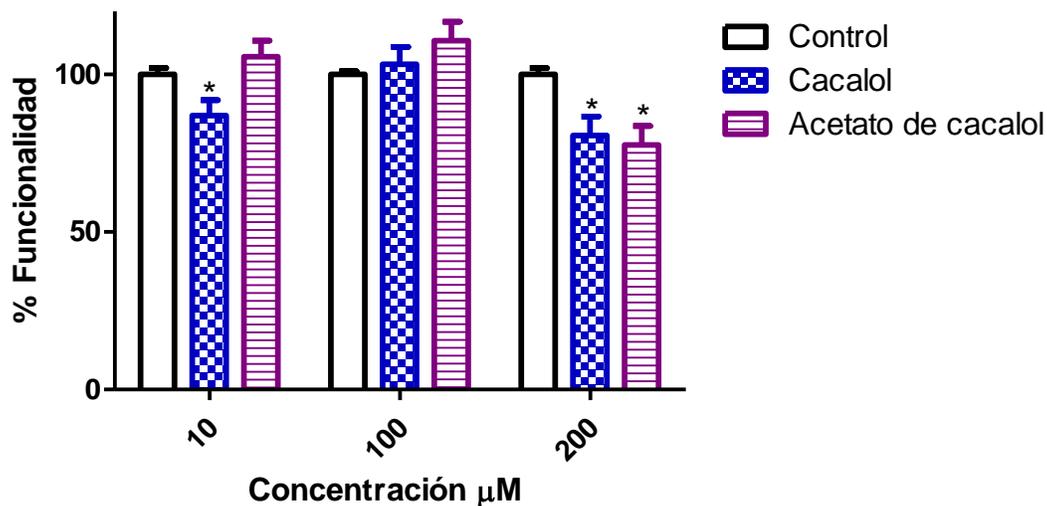


Figura 5. Funcionalidad de las deshidrogenasas en células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos aislados de *P. decompositum* (n=20); * Diferencia significativa respecto al control (p< 0.05).

9.2.3 Secreción de TNF- α , IL-6, IL- β e IL-10.

9.2.3.1 Curvas de liberación de citocinas

Para poder determinar el tiempo adecuado para cuantificar la secreción de las diferentes citocinas en las células RAW 264.7, después de haber sido estimuladas con LPS, se hizo la cuantificación a diferentes tiempos. Se observó que TNF- α a los 30 minutos tiene su pico máximo de liberación; IL-6 e IL-1 β tienen su pico máximo a los 60 minutos; IL-10 fue observado al final de la prueba (4 h).

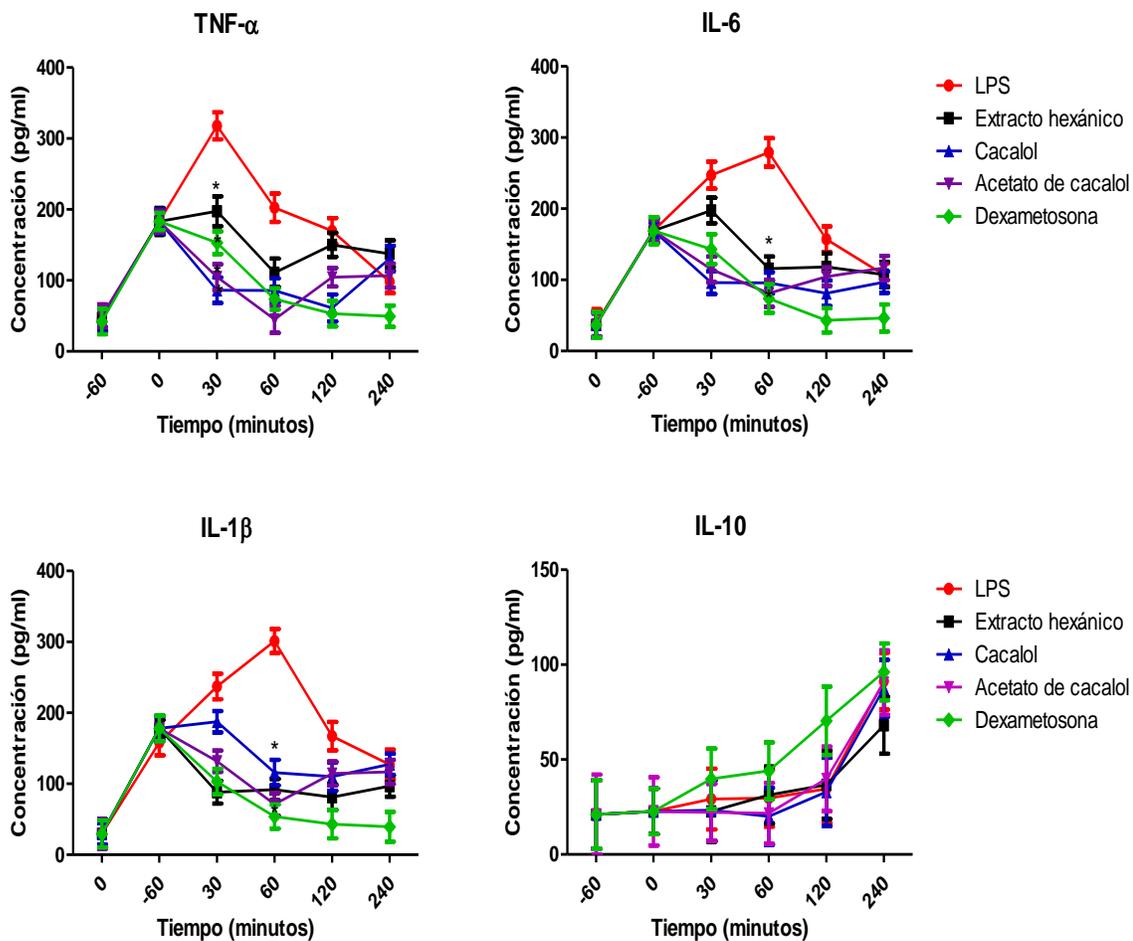


Figura 6. Secreción de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 en células tratadas con LPS y posteriormente con el extracto hexánico de *P. decompositum*, cacalol, acetato de cacalol y dexametasona (control positivo). Se observa que el pico máximo de liberación de TNF- α es a los 30 min, el de IL-6 e IL-1 β a los 60 min y el de IL-10 no se logró apreciar a los 240 min. *Diferencia significativa respecto al grupo control (LPS) ($p < 0.05$). Media \pm E.E.M. ($n=5$). ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

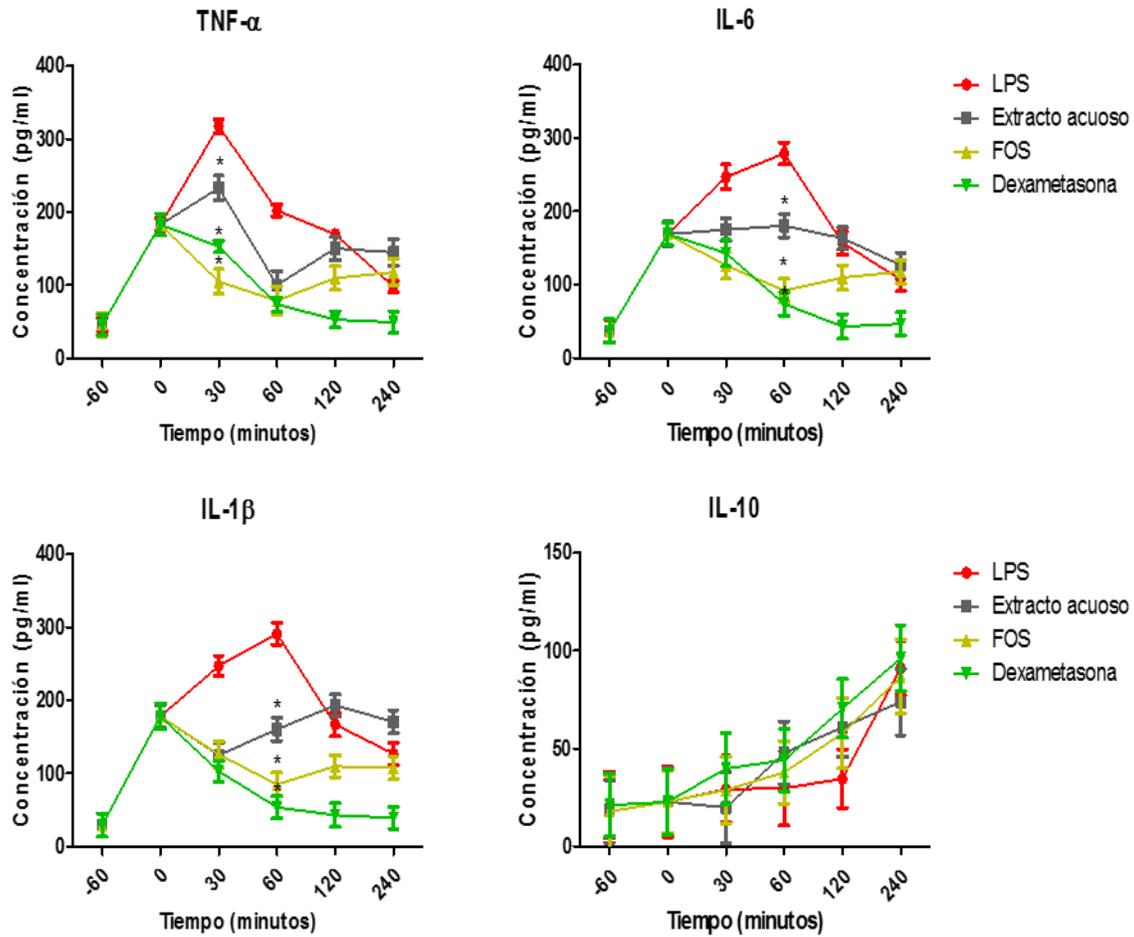


Figura 7. Secreción de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 en células tratadas con LPS y posteriormente con el extracto acuoso de *P. decompositum*, FOS y dexametasona (control positivo). Se observa que el pico máximo de liberación de TNF- α es a los 30 min, el de IL-6 e IL-1 β a los 60 min y el de IL-10 no se logró apreciar a 240 min. *Diferencia significativa respecto al grupo control (LPS) ($p < 0.05$). Media \pm E.E.M. ($n=5$). ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

9.2.3.2 Cuantificación de citocinas en tiempos determinados.

Como se observó en las gráficas anteriores, las células que sólo fueron tratadas con LPS presentaron picos máximos de liberación de TNF- α a los 30 min y de IL-6 e IL-1 β a los 60 min. A esos tiempo se observó el comportamiento de las células tratadas con LPS y con los diferentes tratamientos (extractos hexánico y acuoso, fracción FOS, cacalol y acetato de cacalol). Los tratamientos disminuyeron de manera significativa los niveles de las diferentes citocinas.

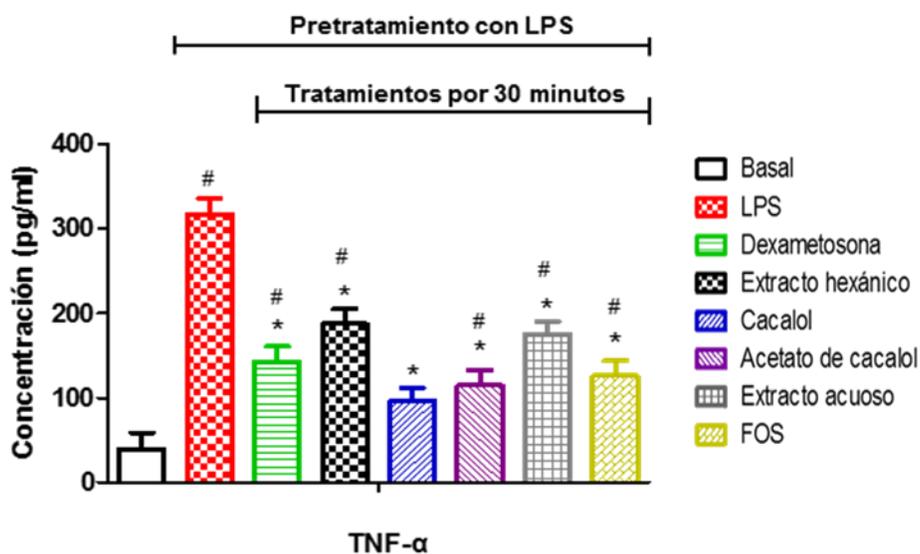


Figura 8. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la liberación de TNF- α en células RAW 264.7. Media \pm E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p < 0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p < 0.05$).

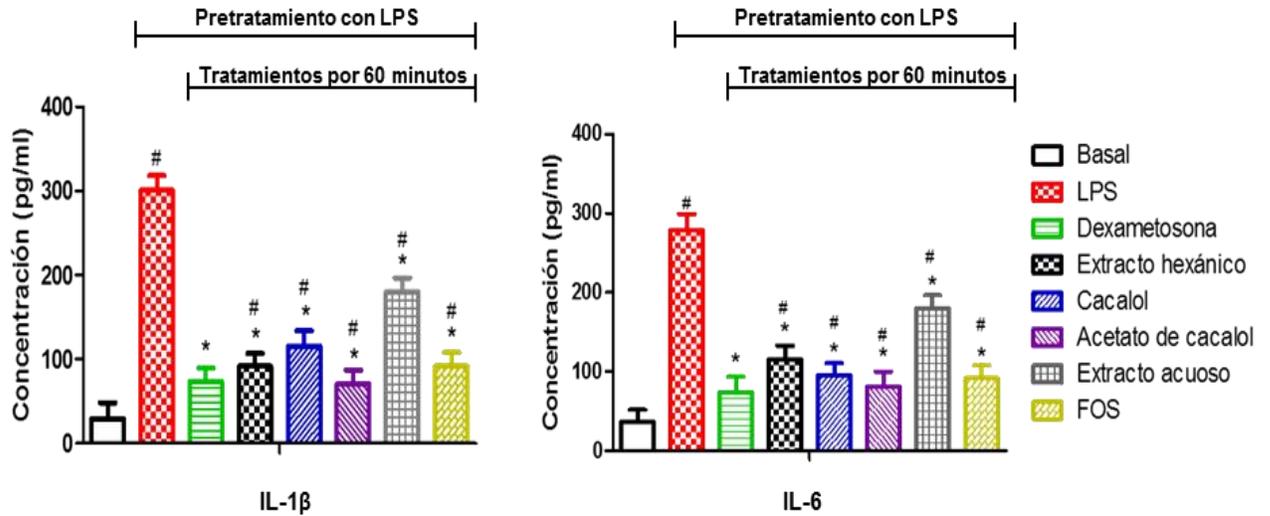


Figura 9. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la liberación de IL-6 en células RAW 264.7. Media±E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p<0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p<0.05$).

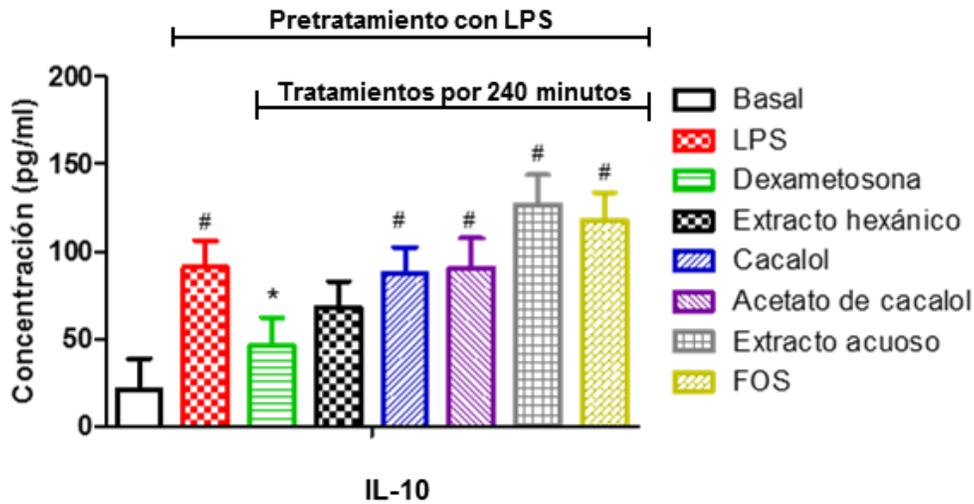


Figura 10. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la liberación de IL-10 en células RAW 264.7. Media ± E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p<0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p<0.05$).

9.2.4 Expresión de los genes de TNF- α , IL-6, IL1 β , IL-10 y COX-2.

Las células tratadas con el extracto hexánico, acuoso, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS disminuyeron significativamente la expresión de los genes de TNF- α , IL-6, IL1 β , y COX-2 en comparación con el grupo que solo fue estimulado con LPS. En caso de IL-10 no se observó diferencia significativa con respecto a control.

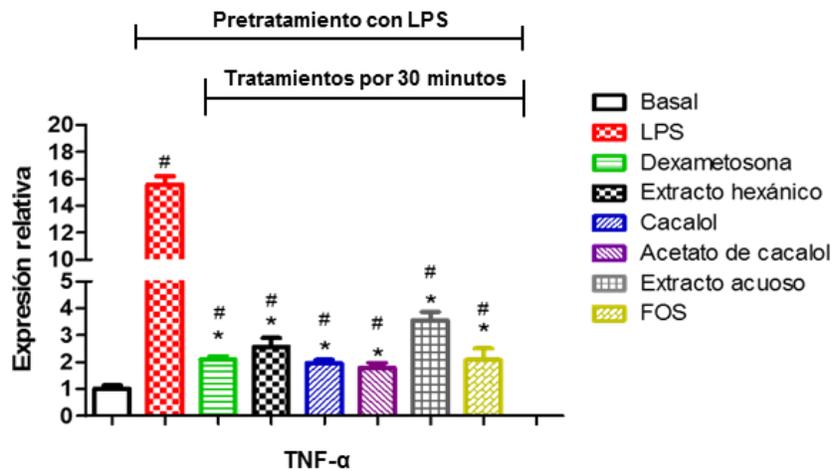


Figura 11. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la expresión relativa de TNF- α en células RAW 264.7 después de haber sido tratadas con LPS. Media \pm E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p < 0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p < 0.05$).

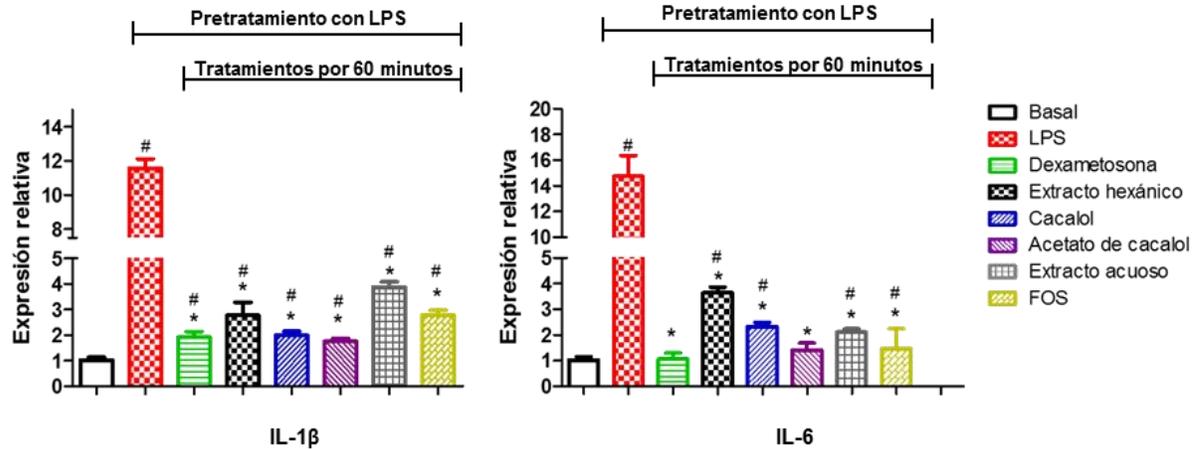


Figura 12. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la expresión relativa de IL-1 β e IL-6 en células RAW 264.7 después de haber sido tratadas con LPS. Media \pm E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p < 0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p < 0.05$).

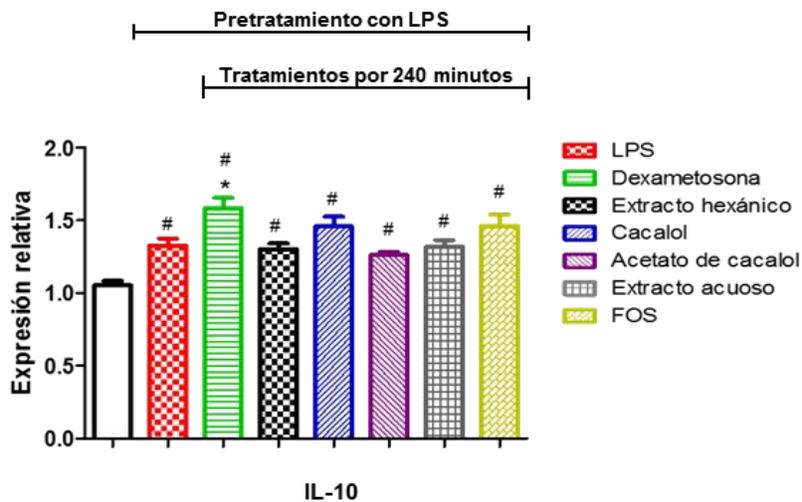


Figura 13. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la expresión relativa de IL-10 en células RAW 264.7 después de haber sido tratadas con LPS. Media \pm E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el Control-LPS ($p < 0.05$); #diferencias significativas comparadas con el basal ($p < 0.05$).

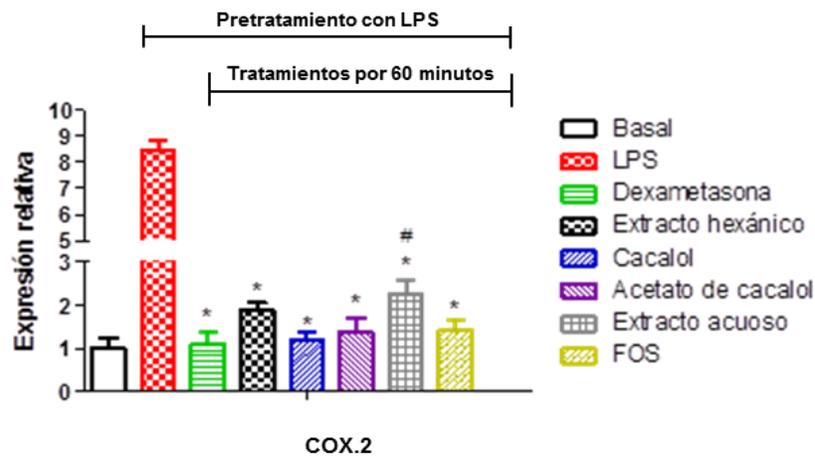


Figura 14. Efecto del extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum* sobre la expresión relativa de COX-2 en células RAW 264.7 después de haber sido tratadas con LPS. Media±E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el Control-LPS (*p<0.05); #diferencias significativas comparadas con el basal (p<0.05).

9.2.5 Determinación de la fosforilación de p65 subunidad de NFκB.

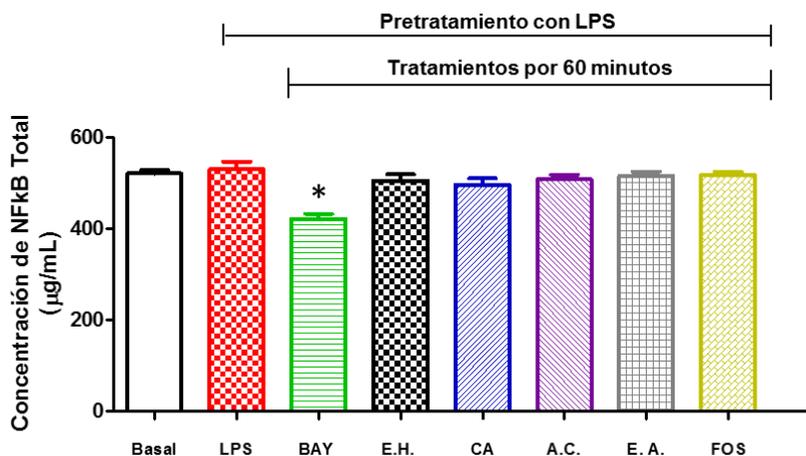


Figura 15. Concentración de NF-κB (total) en los macrófagos pretratados con LPS y posteriormente tratados con el extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum*. Cuantificación de las concentraciones de NF-κB (total) de lisados celulares de macrófagos. Media±E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p < 0.05$).

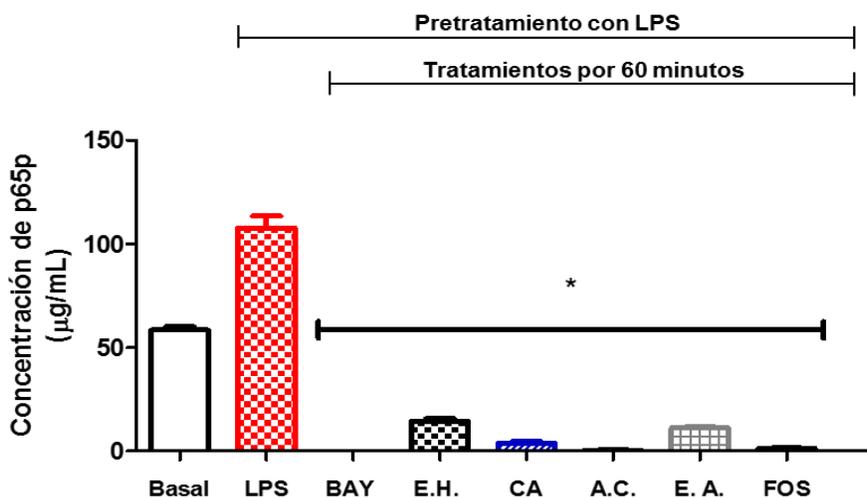


Figura 16. Concentración de NF-κB p65 (pS536) en los macrófagos pretratados con LPS y con el extracto hexánico, acuoso y los compuestos aislados de *P. decompositum*. Cuantificación de las concentraciones de NF-κB fosforilado en serina 536 de lisados celulares de macrófagos. Media±E.E.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. *Diferencias significativas comparadas con el control-LPS ($p < 0.05$).

10. DISCUSIÓN.

La inflamación es una respuesta del organismo ante un estímulo. Ésta tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica cambios vasculares, eventos celulares, y la producción de mediadores químicos de la inflamación. Todos estos componentes del sistema están estrechamente vinculados. En algunas patologías se mantiene de forma constante dicho proceso, lo cual ocasiona que se desregule y, con ello, se exacerbe la intensidad de la enfermedad, favoreciendo la severidad de la enfermedad e incluso la mortalidad de la misma. Para este tipo de padecimientos ya existen fármacos en el mercado, los cuales tratan de aminorar el proceso inflamatorio, sin embargo, en algunos padecimientos la causa es desconocida o presenta un importante componente genético, por lo que el uso de dichos fármacos antiinflamatorios se vuelve crónico. Los AINEs se encuentran entre las alternativas farmacológicas más utilizadas y continuamente surgen nuevas preparaciones, lo que habla de que aún no se ha encontrado el antiinflamatorio ideal. Un problema adicional es que prácticamente todos presentan el riesgo de generar efectos adversos importantes en los pacientes. En este sentido, un tratamiento ideal sería aquel que disminuyera los signos de la inflamación y controle sus secuelas perjudiciales (Khan, Saraf et al. 2016, Woodward, Wang et al. 2016). No es extraño, por lo tanto, que la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios, tanto por síntesis química como a partir de productos naturales, continúe intensamente.

En la literatura se enfatizan ciertas plantas con efecto antiinflamatorio en modelos in vivo, las cuales principalmente contienen flavonoides, glucósidos y terpenos, algunos también con capacidad antioxidante (Alves-Silva, Monica et al. 2016, Chun-

Yan Shen 2016, Filannino, Cavoski et al. 2016). Sin embargo, de la mayoría de estos compuestos aún no se conoce su mecanismos de acción, aunque se sugiere que un evento importante en el mecanismo de acción sea la inhibición de las enzimas que generan PG y LT, tales como la fosfolipasa A2, COX's y LOX's, cuya inhibición reduce las concentraciones de PG y LT, involucrados en respuestas inmunológicas (Middleton y Kandaswami, 1994; Nijveldt y col., 2001; Kim y col., 2004; Silva y col., 2005).

Un ejemplo de este tipo de plantas con actividad antiinflamatoria es *Psacalium decompositum*, la cual se ha reportado con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en modelos agudos. En estudios previos se ha demostrado que una fracción fructooligosacárida de *Psacalium decompositum* produce un efecto antiinflamatorio sistémico en un modelo de síndrome metabólico. Así mismo, otros compuestos terpénoides, tal como el cacalol, también se ha visto que tiene actividad antiinflamatoria (Jimenez-Estrada, Chilpa et al. 2006, Merino-Aguilar, Arrieta-Baez et al. 2014). Sin embargo, poco se ha avanzado en el conocimiento del mecanismo de acción antiinflamatoria de estos compuestos.

Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos y los principales compuestos en *Psacalium decompositum*. Para esto, primero se realizó la obtención del extracto hexánico y del extracto acuoso para poder obtener cacalol y la fracción FOS. En el caso del cacalol, dado que es un compuesto que se puede oxidar fácilmente, se decidió proteger su grupo fenólico mediante una reacción de acetilación, formando acetato de cacalol, el cual es más fácil de obtener. Posteriormente se le realizó una hidrólisis para obtener cacalol y ambos utilizarlos en las pruebas biológicas (P. Joseph-

Nathan 1970). Debido a que en el proceso de obtención de cacalol se obtuvo al acetato de cacalol y considerando que existen pocos reportes acerca de la actividad biológica de dicho compuesto, éste se incluyó en la evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los extractos hexánico y acuoso así como del cacalol, acetato de cacalol y FOS, utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA. Mediante este ensayo se logró apreciar que el extracto hexánico presentó mayor actividad antiinflamatoria, con un porcentaje de inhibición del 39.2%; mientras que el extracto acuoso no tuvo efecto antiinflamatorio. El cacalol y el acetato de cacalol, compuestos aislados del extracto hexánico, presentaron mayor actividad antiinflamatoria (> a 40%), el cual fue mayor que el mismo extracto de donde se aislaron, lo cual permite suponer que el cacalol es una de las moléculas responsables del efecto antiinflamatorio generado por el extracto hexánico. Dado que el extracto hexánico generó un 39.2% de inhibición, el cual es menor que el generado por el compuesto puro, se puede sugerir la presencia de otras moléculas en el extracto que antagonizan el efecto antiinflamatorio.

A pesar de que los porcentajes de inhibición del extracto hexánico, del cacalol y del acetato de cacalol no fueron superiores a los del control positivo dexametasona (51.2%), se pueden sugerir como compuestos antiinflamatorios con un importante potencial terapéutico, ya que se encuentran dentro de los porcentajes de inhibición que maneja la literatura, entre 35 y 65% de inhibición del edema (María Cristina González Guevara 2011). La fracción FOS también produjo efecto antiinflamatorio (27.8%); sin embargo, éste fue menor al registrado con los otros compuestos.

El mecanismo de inducción de la inflamación por el TPA consiste en activar a la PKC, la cual activa a su vez a la PLA2 y ésta libera AA, que es el precursor de PGs y LTs, los cuales son vasodilatadores que facilitan la formación del edema. Por lo tanto, entre más PGs y LTs existan, mayor tamaño del edema, mientras que a menos PGs y LTs menor será el tamaño del edema (Barbosa LA 2003). Por lo tanto, si el extracto hexánico, el cacalol y el acetato de cacalol inhiben la formación del edema entonces también podrían inhibir la vía de síntesis de mediadores lipídicos, probablemente podrían inhibir a la PLA2, similar a los AIEs; o generar efectos sobre la COX-2, la cual transforma el AA en PG y LT ambos cambios serían similares a los producidos por los AINEs (Gautam, Jachak et al. 2011, Liu, Moon et al. 2016).

En el caso del modelo de estimulación de macrófagos con LPS en cultivo, primero se realizó una prueba de MTT para determinar el potencial efecto citotóxico de los extractos y los compuestos, así como determinar la concentración óptima para los experimentos posteriores. En esta prueba se utilizó como base la sal de azul de tetrazolio, también llamada MTT o metil-tiazolil-tetrazolio (Mosmann 1983). Se trata de un ensayo colorimétrico utilizado en estudios de citotoxicidad y viabilidad celular. La prueba se basa en la cantidad de MTT que es reducido a formazán, principalmente por las deshidrogenasas que se encuentran en las células funcionales (Mathews CK. 2002). La concentración de formazán es directamente proporcional al número de células vivas, por lo que es utilizado como un marcador de viabilidad celular (Stockert JC 2012).

En general los macrófagos presentaron una viabilidad celular superior al 95% después de los tratamientos con extracto acuoso y hexánico a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con cacalol y acetato de cacalol a 10 y 100 μM . La concentración

de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos acuoso y hexánico, al igual que la concentración de 200 μM de cacalol y acetato de cacalol redujeron la viabilidad de los macrófagos en un 20%. La concentración seleccionada del extracto acuoso y hexánico para continuar los estudios con los macrófagos fue de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que no produjeron cambios significativos con respecto al control (Figura 4). La concentración seleccionada para la fracción FOS fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujeron la viabilidad en 20% (Figura 4); para el cacalol y el acetato de cacalol se seleccionó la concentración de 100 μM .

Se realizaron cuantificaciones de las citocinas a diferentes tiempos después de estimular a los macrófagos con LPS, generando curvas de liberación de citocinas con la finalidad de seleccionar los tiempos más convenientes para cuantificar la expresión de las siguientes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Las primeras 3 citocinas se seleccionaron porque son iniciadoras importantes de la respuesta inflamatoria; así mismo, participan en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias, estimulando la llegada de NO y PGE a la lesión tisular, y contribuyendo al fallo múltiple de órganos. Por su parte, IL-10 tiene importantes efectos reguladores sobre la respuesta inflamatoria, debido a su capacidad para regular la disminución de la expresión de MHC II y para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (By Ren de Waal Malefyt 2012, Bak, Truong et al. 2013, Jessica Y. Hsieh 2016).

La mayor liberación de TNF- α se alcanza a los 30 minutos mientras que para IL-1 β e IL-6 ocurre hasta los 60 minutos; en el caso de IL-10 se observa un incremento gradual de la concentración contra el tiempo, con un pico máximo de liberación al

final de la prueba. Es probable que a tiempos más largos la liberación de esta citocina continúe incrementándose, aunque esto deberá de ser determinado en estudios futuros.

Después de conocer los tiempos específicos se cuantificó y se midió la expresión relativa de estas citocinas después de ser estimuladas con LPS y tratadas con los extractos y compuestos. Todos los tratamientos redujeron la liberación y expresión de TNF- α en comparación con el grupo control tratado con LPS solo. El tratamiento que redujo más la concentración de TNF- α fue el de cacalol, el cual fue el único que prácticamente restableció el nivel basal ($p > 0.05$). De hecho, este efecto fue más intenso que el inducido por dexametasona (control positivo). Estos resultados son importantes, ya que esta citocina juega un papel clave en la inducción y perpetuación de la inflamación mediante la activación de los macrófagos y regulación al alza de otras citocinas proinflamatorias, así como de otras moléculas de adhesión endoteliales, teniendo implicaciones muy importantes en procesos inflamatorios (Chun-Yan Shen 2016, Filannino, Cavoski et al. 2016). Una situación muy similar se observó en los casos de IL-1 β e IL-6, dos citocinas típicas que aumentan por estimulación de LPS y que tienen un papel importante en la fase aguda de la inflamación (Barrette AM1 2016). Todos los extractos y compuestos redujeron significativamente ambas citocinas; sin embargo, en ambos casos la dexametasona fue la que causó el mayor efecto, alcanzando prácticamente los mismos valores basales ($P > 0.05$). En el caso de la fracción FOS los resultados obtenidos coinciden con lo reportado con anterioridad en un modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa. En este sentido, se sabe que la obesidad está

relacionada con un proceso inflamatorio, ya que en ésta se activa de manera crónica a monocitos, macrófagos y neutrófilos, generando una producción anormal de TNF- α , IL-1 β e IL6 (Merino-Aguilar, Arrieta-Baez et al. 2014).

La capacidad de inhibir la expresión y liberación de citocinas inflamatorias representa una estrategia vital en el tratamiento de padecimientos que cursan por un proceso inflamatorio. Dado que los extractos y compuestos aislados de *P. decompositum* generan una respuesta antiinflamatoria que implica la participación de citocinas proinflamatorias, disminuyendo la liberación y expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6, sin afectar los niveles de IL-10, se sugiere que estos compuestos y extractos regulan a la baja la respuesta de fase aguda en macrófagos estimulados con LPS. Por lo tanto, al inhibir la liberación excesiva e inadecuada de dichas citocinas, estos compuestos controlan el proceso inflamatorio y, con ello, podrían prevenir el desarrollo de diversas enfermedades con un componente inflamatorio.

Además, el extracto hexánico y acuoso, así como el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS redujeron significativamente la expresión de COX-2. Existen dos isoformas de COX (COX-1 y COX-2); de éstas, COX-2 juega un papel importante en el proceso inflamatorio, ya que es la encargada de transformar el AA en PGs (Choy, Hu et al. 2008). Los agentes químicos antiinflamatorios disponibles actúan a través de la supresión de las PGs por inhibición de COX-2, ya sea inhibiendo directamente su acción y/o su expresión (Ip and Medzhitov 2015, Hoppstadter, Hachenthal et al. 2016, Kwon 2016). Dado que los extractos y compuestos de *Psacalium decompositum* inhibieron la expresión de COX-2, es probable que actúen mediante la supresión de la transcripción COX2.

En este sentido, está reportado que TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 son regulados principalmente a nivel transcripcional por p50 y p65; estas son dos subunidades, que conforman a NF- κ B, son importantes para la activación de este factor cuando los macrófagos son estimulados por LPS (Ghosh y Karin, 2002). Cuando no hay estímulo que active a NF- κ B, éste se encuentra inhibido por I κ B- α y no puede translocarse al núcleo (Baldwin, 1996). La vía de señalización de NF- κ B puede ser activada por diferentes estímulos (LPS, TNF- α , IL-1 β , etc). Existen dos puntos clave en la señalización de esta vía, una es la fosforilación de I κ B- α y la otra es la fosforilación de la subunidad p65. Una vez fosforilada esta subunidad, ésta se transloca al núcleo y se lleva a cabo la transcripción de genes diana implicados en el proceso inflamatorio.

Los resultados muestran que los extractos y compuestos de *Psacalium decompositum* disminuyen casi por completo la fosforilación de p65, subunidad de NF- κ B, lo cual nos indica que la vía no se está activando (Figura 15 y 16). Por lo tanto, si TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 se generan por activación NF- κ B, y los compuestos y extractos inhiben esta vía, entonces los compuestos y extractos actúan a nivel de NF- κ B, impidiendo la producción de mediadores proinflamatorios y favoreciendo la disminución del edema generado en el modelo agudo por TPA.

Si conjuntamos los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* (modelo de TPA) con los obtenidos en el modelo *in vitro* (macrófagos estimulados con LPS), podemos esperar que el extracto hexánico, acuoso, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS disminuirán la producción de PGs y LTs debido a que disminuyen la expresión de COX-2, la enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas. Los

extractos y compuestos de *Psacalium decompositum* redujeron la expresión de esta enzima, al igual que la de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, debido a la inhibición de la fosforilación de p65, impidiendo la activación de este factor de transcripción, como se explica en la Figura 18.

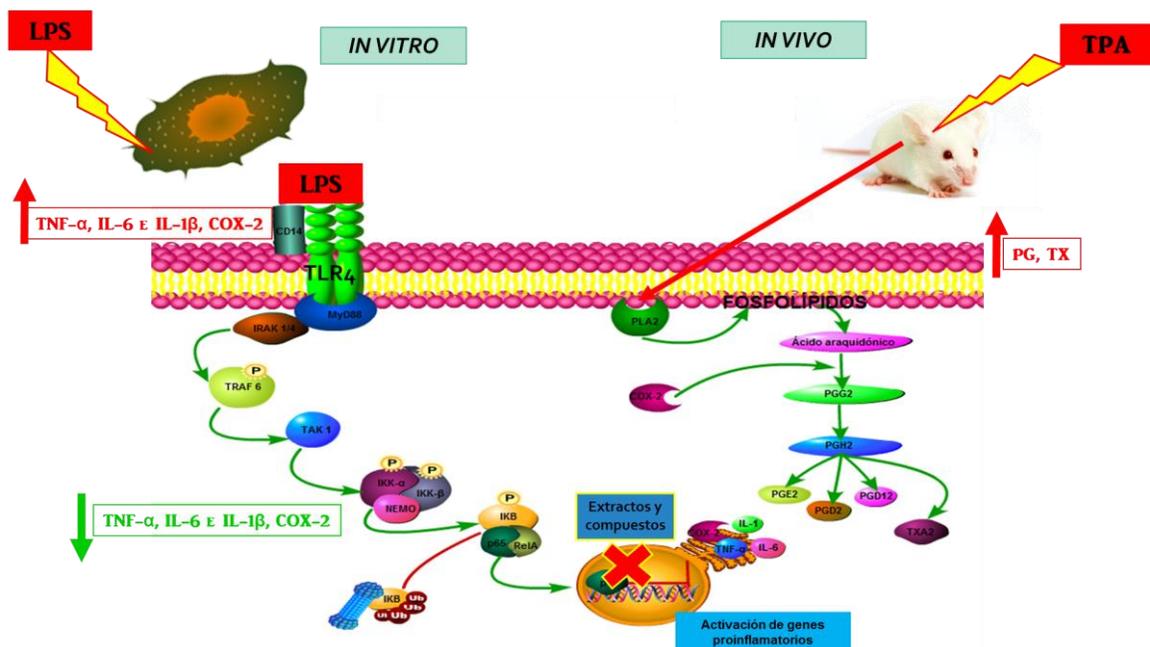


Figura 18. Posible mecanismo por el cual pueden estar actuando el extracto hexánico, acuoso, el cacalol, el acetato de cacalol obtenidos de *Psacalium decompositum*.

11. CONCLUSIONES

- El extracto hexánico, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS obtenidos de *P. decompositum* tienen efecto antiinflamatorio en el modelo de TPA
- El extracto hexánico, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS obtenidos de *P. decompositum* reducen las concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (citocinas proinflamatorias), pero no modifican los niveles de IL-10 (citocina antiinflamatoria).
- El extracto hexánico, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS obtenidos de *P. decompositum* disminuyen la expresión relativa de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y COX-2, pero no modifican la expresión de IL-10.
- El extracto hexánico, el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS obtenidos de *P. decompositum* disminuyen la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B.
- El mecanismo de la acción antiinflamatoria del cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS, involucra cambios en la activación de NF- κ B, lo que afecta la expresión, la liberación y la actividad de sus genes regulados.

12. PERSPECTIVAS

- Cuantificar el grado de fosforilación del complejo IKK (IKK- α , IKK- β e IKK- γ) cuando los macrófagos son tratados con el cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS.
- Establecer la participación del cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS en otras vías de señalización relacionadas con la inflamación como la vía asociada a receptores tipo toll.
- Determinar el efecto del cacalol, el acetato de cacalol y la fracción FOS sobre la activación de otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP1) o las proteínas STAT blancos importante en la respuesta inflamatoria.

13. REFERENCIAS

- Abiodun, O. O., A. Rodriguez-Nogales, F. Algieri, A. M. Gomez-Caravaca, A. Segura-Carretero, M. P. Utrilla, M. E. Rodriguez-Cabezas and J. Galvez (2016). "Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences." J Ethnopharmacol **192**: 309-319.
- Abraham, C. and R. Medzhitov (2011). "Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **140**(6): 1729-1737.
- Alves-Silva, J. M., Z. Monica, M. Carla, S. Ligia and G. Henrique (2016). "Protective effects of terpenes on the cardiovascular system: Current advances and future perspectives." Curr Med Chem.
- Anaya, A. L., B. E. Hernandez-Bautista, A. Torres-Barragan, J. Leon-Cantero and M. Jimenez-Estrada (1996). "Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), matarique or maturin." J Chem Ecol **22**(3): 393-403.
- Andreas, K., T. Haupl, C. Lubke, J. Ringe, L. Morawietz, A. Wachtel, M. Sittinger and C. Kaps (2009). "Antirheumatic drug response signatures in human chondrocytes: potential molecular targets to stimulate cartilage regeneration." Arthritis Res Ther **11**(1): R15.
- Bahl, A., S. M. Jachak, K. Palaniveloo, T. Ramachandram, C. S. Vairappan and H. K. Chopra (2014). "2-Acetoxyverecynarmin C, a new briarane COX inhibitory diterpenoid from *Pennatula aculeata*." Nat Prod Commun **9**(8): 1139-1141.
- Bak, M. J., V. L. Truong, H. S. Kang, M. Jun and W. S. Jeong (2013). "Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells." Oxid Med Cell Longev **2013**: 409321.
- Balunas, M. J. and A. D. Kinghorn (2005). "Drug discovery from medicinal plants." Life Sci **78**(5): 431-441.

- Barbosa LA, G.-S. L., Redondo PA, Oliveira S, Montesano G, De Souza W, Morgado-Díaz JA. (2003). "TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells." Cell Tissue Res. **312**(3): 319-331.
- Barnes, P. J. (2016). "Glucocorticosteroids." Handb Exp Pharmacol.
- Barrette AM1, R. J., Chapin C, Egan EA, Segal MR, Osés-Prieto JA, Chand S, Burlingame AL, Ballard PL1. (2016). "Antiinflammatory Effects of Budesonide in Human Fetal Lung." Am J Respir Cell Mol Biol. **55**(5): 623-632.
- Brandenburg K, H. L., Correa W, Fukuoka S, Gutschmann T, Zähringer U, Koch MH. (2016). "Supramolecular structure of enterobacterial wild-type lipopolysaccharides (LPS), fractions thereof, and their neutralization by Pep19-2.5." J Struct Biol. **194**(1): 68-77.
- Buckley, C. D., D. W. Gilroy, C. N. Serhan, B. Stockinger and P. P. Tak (2013). "The resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **13**(1): 59-66.
- By Ren de Waal Malefyt, J. A., Bruce Bennett, Carl G. Figdor, and Jan E. de Vries (2012). "Interleukin 10(EL,10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes " Exp. Med **174**.
- Campos, M. G., M. Oropeza, C. Torres-Sosa, M. Jimenez-Estrada and R. Reyes-Chilpa (2009). "Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium decompositum* block ATP sensitive potassium channels." J Ethnopharmacol **123**(3): 489-493.
- Castro, J. P., Y. C. Ocampo and L. A. Franco (2014). "In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Cryptostegia grandiflora* Roxb. ex R. Br. leaves." Biol Res **47**: 32.
- Cervini-Silva, J., A. Nieto-Camacho, E. Palacios, J. A. Montoya, V. Gomez-Vidales and M. T. Ramirez-Apan (2013). "Anti-inflammatory and anti-bacterial activity, and cytotoxicity of halloysite surfaces." Colloids Surf B Biointerfaces **111**: 651-655.

- Correa , J., Romo, J., (1966). "The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray. Structures of , maturinin, matuton and maturinone. ." Tetrahedron **22**: 685-691.
- Cheekavolu, C. and M. Muniappan (2016). "In vivo and In vitro Anti-Inflammatory Activity of Indazole and Its Derivatives." J Clin Diagn Res **10**(9): FF01-FF06.
- Cho, B. O., H. W. Ryu, Y. So, J. K. Cho, H. S. Woo, C. H. Jin, K. I. Seo, J. C. Park and I. Y. Jeong (2013). "Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from *Stevia rebaudiana* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages." Food and Chemical Toxicology **62**: 638-644.
- Cho, B. O., Y. So, C. H. Jin, B. M. Nam, S. T. Yee and I. Y. Jeong (2014). "3-deoxysilybin exerts anti-inflammatory effects by suppressing NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **78**(12): 2051-2058.
- Chovatiya, R. and R. Medzhitov (2014). "Stress, inflammation, and defense of homeostasis." Mol Cell **54**(2): 281-288.
- Choy, C. S., C. M. Hu, W. T. Chiu, C. S. Lam, Y. Ting, S. H. Tsai and T. C. Wang (2008). "Suppression of lipopolysaccharide-induced of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by *Sanguis Draconis*, a dragon's blood resin, in RAW 264.7 cells." J Ethnopharmacol **115**(3): 455-462.
- Chun-Yan Shen, T.-T. Z., † Wen-Li Zhang and Jian-Guo Jiang (2016). "Anti-inflammatory activities of essential oil isolated from the calyx of *Hibiscus sabdariffa* L." Food & Function: 451–4459.
- Decano, J. L., P. C. Mattson and M. Aikawa (2016). "Macrophages in Vascular Inflammation: Origins and Functions." Curr Atheroscler Rep **18**(6): 34.
- Filannino, P., I. Cavoski, N. Thligene, O. Vincentini, M. De Angelis, M. Silano, M. Gobbetti and R. Di Cagno (2016). "Correction: Lactic Acid Fermentation of Cactus Cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) Generates Flavonoid Derivatives

with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties." PLoS One **11**(5): e0155156.

- Filep, J. G. (2013). "Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets." Front Immunol **4**: 256.
- Freire, M. O. and T. E. Van Dyke (2013). "Natural resolution of inflammation." Periodontol 2000 **63**(1): 149-164.
- Fucina, G., L. W. Rocha, G. F. da Silva, S. M. Hoepers, F. P. Ferreira, T. Guaratini, V. Cechinel Filho, R. M. Lucinda-Silva, N. L. Quintao and T. M. Bresolin (2016). "Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts." Pharm Biol **54**(11): 2465-2474.
- Fullerton, J. N. and D. W. Gilroy (2016). "Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier." Nat Rev Drug Discov **15**(8): 551-567.
- Garg, R., A. G. Ramchandani and G. B. Maru (2008). "*Curcumin* decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin." Carcinogenesis **29**(6): 1249-1257.
- Gautam, R., S. M. Jachak and A. Saklani (2011). "Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition." J Ethnopharmacol **133**(2): 928-930.
- Gautam, R., S. M. Jachak and A. Saklani (2011). "Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition." Journal of Ethnopharmacology **133**(2): 928-930.
- Hoppstadter, J., N. Hachenthal, J. V. Valbuena-Perez, S. Lampe, K. Astanina, M. M. Kunze, S. Bruscoli, C. Riccardi, T. Schmid, B. Diesel and A. K. Kiemer (2016). "Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Contributes to Anti-inflammatory Effects of the Natural Product *Curcumin* in Macrophages." J Biol Chem **291**(44): 22949-22960.
- Huang, M. H., B. S. Wang, C. S. Chiu, S. Amagaya, W. T. Hsieh, S. S. Huang, P. H. Shie and G. J. Huang (2011). "Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of *Xanthii Fructus* extract." J Ethnopharmacol **135**(2): 545-552.

- Ip, W. K. and R. Medzhitov (2015). "Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation." Nat Commun **6**: 6931.
- Jantsch, J., K. J. Binger, D. N. Muller and J. Titze (2014). "Macrophages in homeostatic immune function." Front Physiol **5**: 146.
- Jessica Y. Hsieh, T. D. S., Vijaykumar S. Meli, Thi N. Tran, Elliot L. Botvinick, Wendy F. Liu (2016). "Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen." Acta Biomaterialia.
- Jiménez-Estada, M., Lozano, C., Valdés, M.J., Alarcón, G., Sveshtarova, B. (1992). "Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. ." Latinoam Quim **23**: 1-22.
- Jimenez-Estrada, M., R. R. Chilpa, T. R. Apan, F. Lledias, W. Hansberg, D. Arrieta and F. J. Aguilar (2006). "Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*." J Ethnopharmacol **105**(1-2): 34-38.
- Jimenez-Estrada, M., H. Merino-Aguilar, A. Lopez-Fernandez, N. A. Rojano-Vilchis, R. Roman-Ramos and F. J. Alarcon-Aguilar (2011). "Chemical characterization and evaluation of the hypoglycemic effect of fructooligosaccharides from *Psacalium decompositum*." J Complement Integr Med **8**.
- Jones, H. R., C. T. Robb, M. Perretti and A. G. Rossi (2016). "The role of neutrophils in inflammation resolution." Semin Immunol **28**(2): 137-145.
- Khan, M. J., S. Saraf and S. Saraf (2016). "Anti-inflammatory and associated analgesic activities of HPLC standardized alcoholic extract of known ayurvedic plant *Schleichera oleosa*." J Ethnopharmacol.
- Kotas, M. E. and R. Medzhitov (2015). "Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility." Cell **160**(5): 816-827.
- Kratofil, R. M., P. Kubes and J. F. Deniset (2016). "Monocyte Conversion During Inflammation and Injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol.

- Kwon, D. H. (2016). "Anti-inflammatory effects of Ciwujianoside C3, extracted from the leaves of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms, on LPS-stimulated RAW 264.7 cells." Mol Med Rep **14**(4): 3749-3758.
- Lawrence, T. and C. Fong (2010). "The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB." Int J Biochem Cell Biol **42**(4): 519-523.
- Lee, S. Y., H. J. Kim and J. S. Han (2013). "Anti-inflammatory Effect of *Oyster Shell* Extract in LPS-stimulated Raw 264.7 Cells." Prev Nutr Food Sci **18**(1): 23-29.
- Linares, E. and R. A. Bye, Jr. (1987). "A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States." J Ethnopharmacol **19**(2): 153-183.
- Linares E., B., R (1987). "Study of four medicinal plant complexes of northern México and adjacent United States. ." Ethnopharmacol **19**: 153-183.
- Liu, X., S. H. Moon, C. M. Jenkins, H. F. Sims and R. W. Gross (2016). "Cyclooxygenase-2 Mediated Oxidation of 2-Arachidonoyl-Lysophospholipids Identifies Unknown Lipid Signaling Pathways." Cell Chem Biol **23**(10): 1217-1227.
- Lon, H. K., D. Liu and W. J. Jusko (2012). "Pharmacokinetic/ pharmacodynamic modeling in inflammation." Crit Rev Biomed Eng **40**(4): 295-312.
- Manuel Jiménez-Estrada, R. R., Brenda A. Morales, Mirna A. Reyes S., Mario González de la Parra, André Aumelas, and Christopher K. Jankowski (2012). "Synthesis and preliminary biological evaluation of two new cacalol esters of Naproxen and Ibuprofen" Rev. latinoam. quím **40**(2): 106-111.
- María Cristina González Guevara, L. F. O. G., Javier Rincón Velandia (2011). "Antiinflammatory activity of extracts and fractions of *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella Americana* y *Physalis peruviana* obtained from on TPA-induced ear oedema, carrageenan-induced paw oedema and collagen-induced arthritis." Biosalud, **10**(1): 9-18.

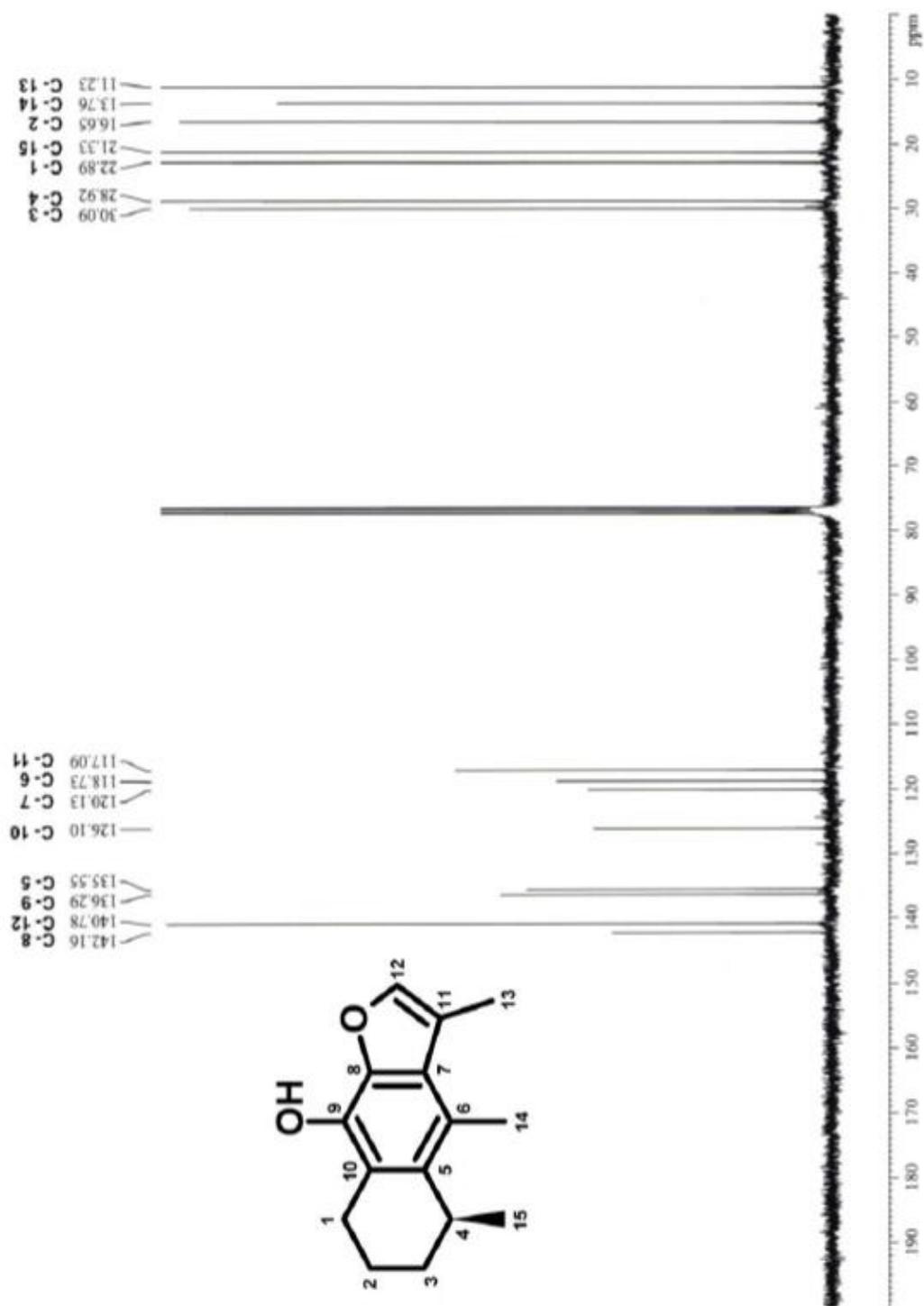
- Mathews CK., V. H. K., Ahern KG. (2002). "Bioquímica." Ed. Editorial PEARSON EDUCACIÓN, S. A., Madrid: 544.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-435.
- Medzhitov, R. and T. Horng (2009). "Transcriptional control of the inflammatory response." Nat Rev Immunol **9**(10): 692-703.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Mendoza-Cruz, M., Castro-Lara, D.; Mera-Ovando, L.M., Chávez-Torrijos, E.K.; Bye-Boettler, R. (2009). "Plantas Medicinales Utilizadas por los Rarámuri de la Sierra Tarahumra, Chihuahua." **1**: 18-20.
- Merino-Aguilar, H., D. Arrieta-Baez, M. Jimenez-Estrada, G. Magos-Guerrero, R. J. Hernandez-Bautista, C. Susunaga-Notario Adel, J. C. Almanza-Perez, G. Blancas-Flores, R. Roman-Ramos and F. J. Alarcon-Aguilar (2014). "Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity." Nutrients **6**(2): 591-604.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- P. Joseph-Nathan, M. C. N., Ma.P. González (1970). "Studies in cacalia species." Phytochemistry **9**(7): 1623-1628.
- Palsson-McDermott, E. M. and L. A. O'Neill (2004). "Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4." Immunology **113**(2): 153-162.
- Park, Y. D., C. H. Jin, D. S. Choi, M. W. Byun and I. Y. Jeong (2011). "Biological evaluation of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* and its synthetic derivatives as anti-inflammatory agents." Arch Pharm Res **34**(8): 1277-1282.

- Passos, G. F., R. Medeiros, R. Marcon, A. F. Nascimento, J. B. Calixto and L. F. Pianowski (2013). "The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice." Eur J Pharmacol **698**(1-3): 413-420.
- Schetter, A. J., N. H. Heegaard and C. C. Harris (2010). "Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways." Carcinogenesis **31**(1): 37-49.
- Siczek, K., H. Zatorski, A. Chmielowiec-Korzeniowska, J. Pulit-Prociak, M. Smiech, R. Kordek, L. Tymczyna, M. Banach and J. Fichna (2016). "Synthesis and evaluation of anti-inflammatory properties of silver nanoparticle suspensions in experimental colitis in mice." Chem Biol Drug Des.
- Siddiqui, F., S. Naqvi, L. Abidi, S. Faizi, Lubna, L. Avesi, T. Mirza and A. D. Farooq (2016). "*Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation." J Ethnopharmacol **182**: 221-234.
- Simpson, B. S., X. Luo, J. Wang, Y. Song, D. Claudie, S. Garg, N. Smith, R. McKinnon and S. Semple (2015). "Development and Evaluation of a Topical Anti-Inflammatory Preparation Containing *Dodonaea polyandra* Extract." J Pharm Pharm Sci **18**(4): 578-599.
- Stockert JC, B.-C. A., Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. (2012). "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets." Acta Histochem. **114**(8): 785-796.
- Theoduloz, C., C. Delporte, G. Valenzuela-Barra, X. Silva, S. Cadiz, F. Bustamante, M. W. Pertino and G. Schmeda-Hirschmann (2015). "Topical Anti-inflammatory Activity of New Hybrid Molecules of Terpenes and Synthetic Drugs." Molecules **20**(6): 11219-11235.
- Thompson, P. A., E. L. Ashbeck, D. J. Roe, L. Fales, J. Buckmeier, F. Wang, A. Bhattacharyya, C. H. Hsu, S. H. Chow, D. J. Ahnen, C. R. Boland, R. I. Heigh, D. E. Fay, S. R. Hamilton, E. T. Jacobs, E. M. Martinez, D. S. Alberts and P. Lance (2016). "Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomas:

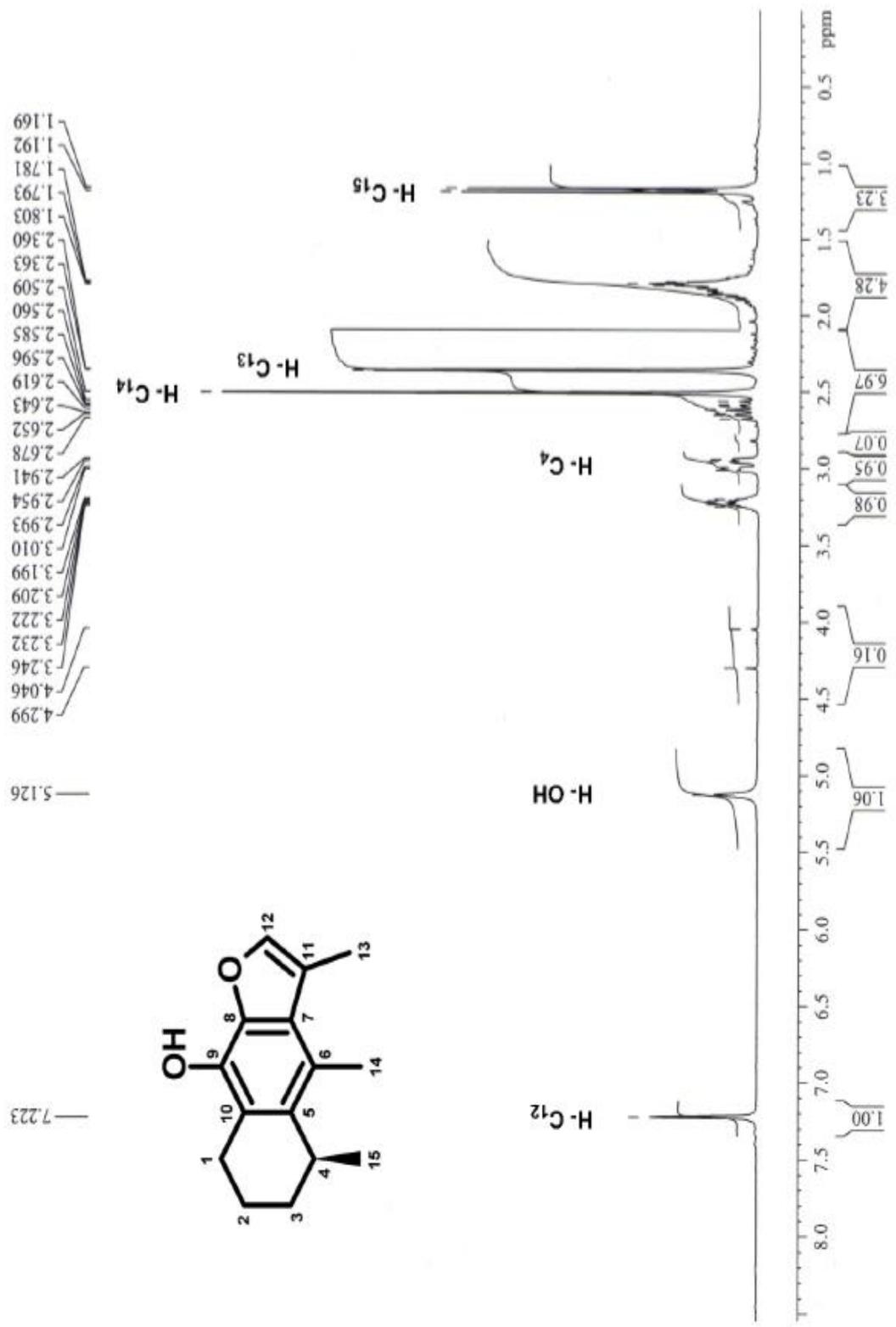
Results of a Suspended Randomized Controlled Trial." J Natl Cancer Inst **108**(12).

- Tsukamoto, H., K. Fukudome, S. Takao, N. Tsuneyoshi and M. Kimoto (2010). "Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells." Int Immunol **22**(4): 271-280.
- van der Spek, A. H., E. Fliers and A. Boelen (2016). "Thyroid hormone metabolism in innate immune cells." J Endocrinol.
- Woodward, D. F., J. W. Wang, M. Ni, A. Bauer, J. L. Martos, R. W. Carling and N. J. Poloso (2016). "In vivo studies validating multitargeting of prostanoid receptors for achieving superior anti-inflammatory effects." FASEB J.
- Wyns, H., E. Plessers, P. De Backer, E. Meyer and S. Croubels (2015). "In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs." Vet Immunol Immunopathol **166**(3-4): 58-69.
- Zheng, Y., S. Lilo, I. E. Brodsky, Y. Zhang, R. Medzhitov, K. B. Marcu and J. B. Bliska (2011). "A Yersinia effector with enhanced inhibitory activity on the NF-kappaB pathway activates the NLRP3/ASC/caspase-1 inflammasome in macrophages." PLoS Pathog **7**(4): e1002026.

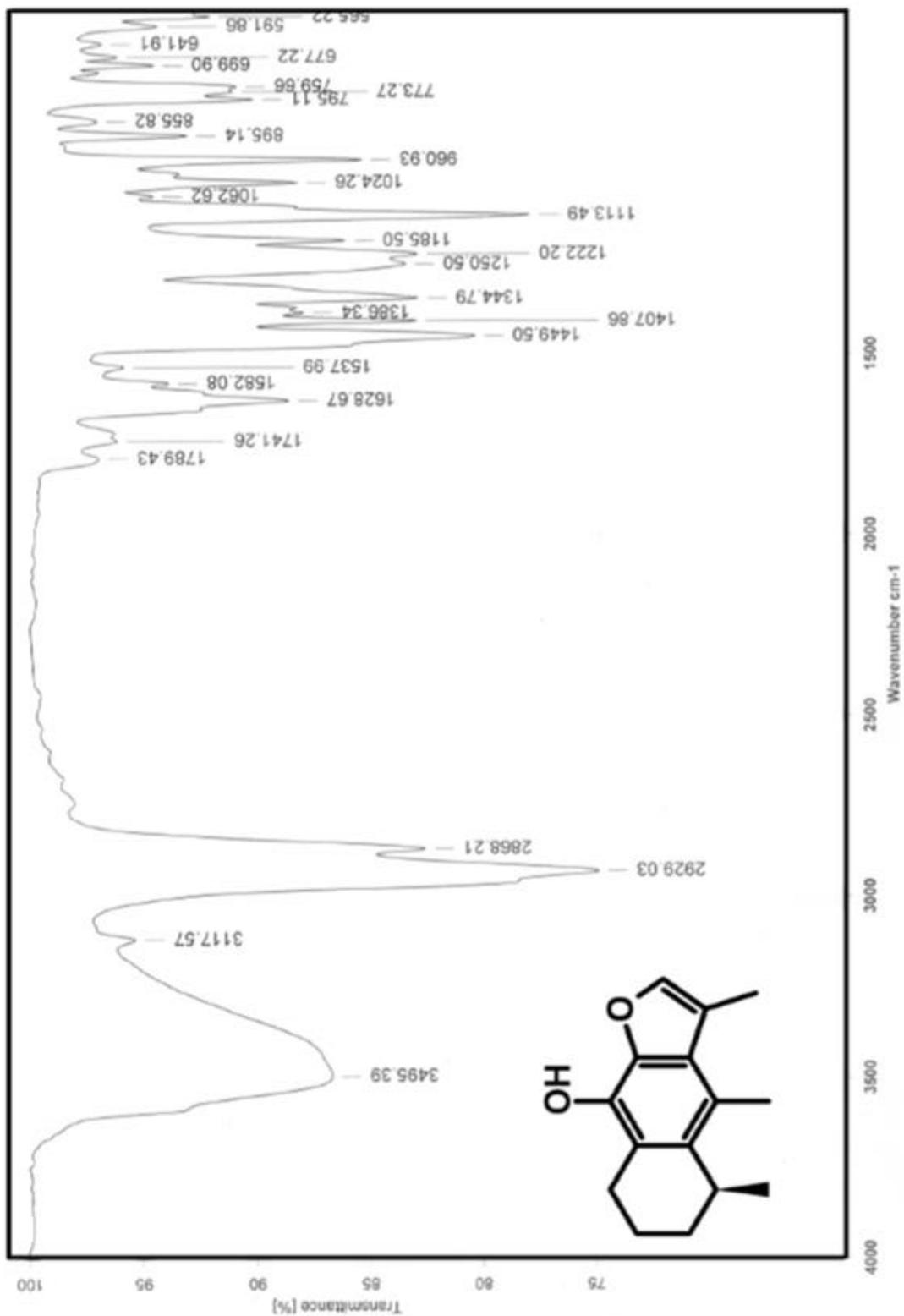
14. ANEXOS



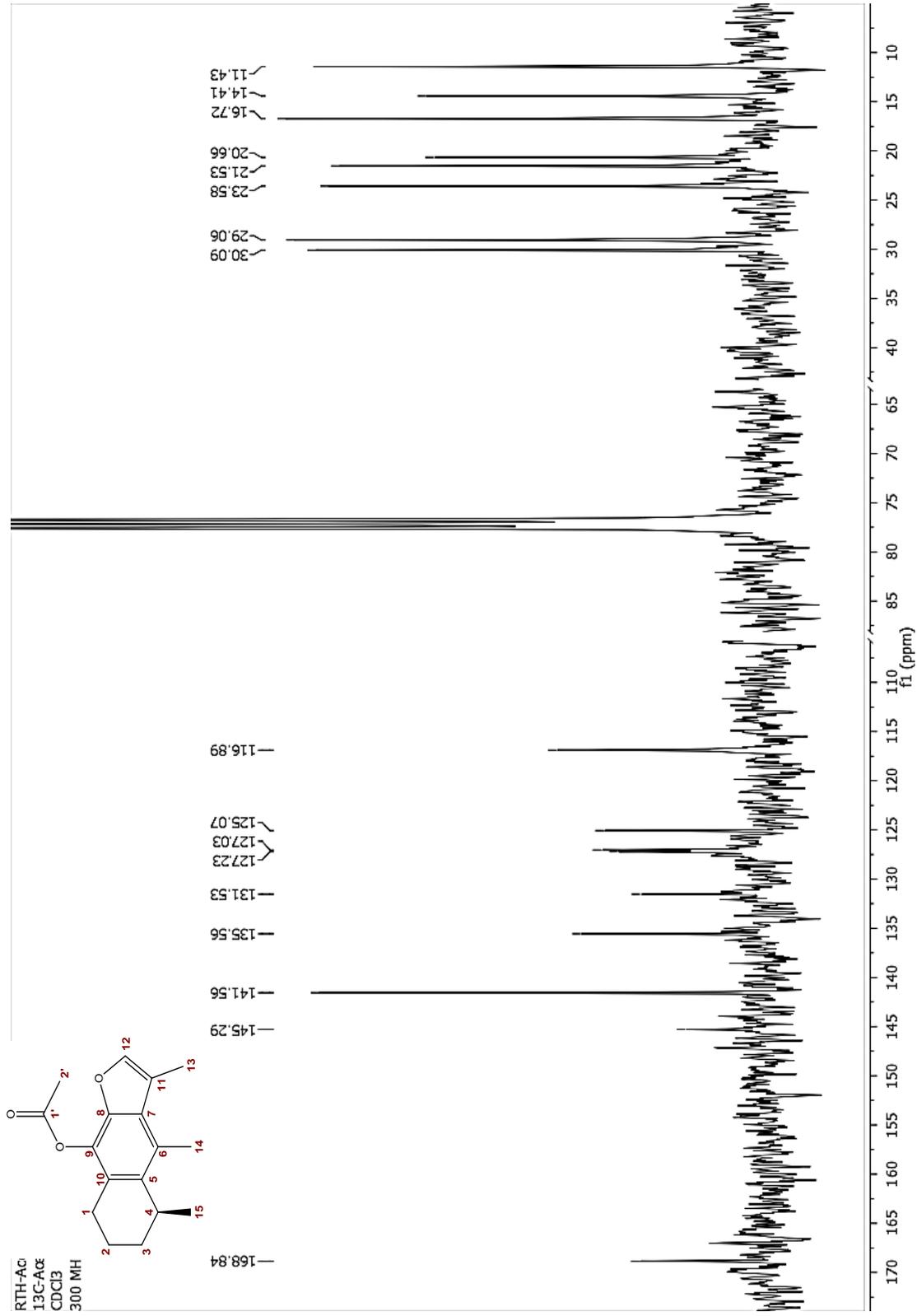
Espectro 1. Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃ 300 MHz) de cacalol



Espectro 2. Espectro de ¹H RMN (CDCl₃ 300 MHz) de cacalol



Espectro 3. Espectro de IR (CHCl₃, disolución) de cacalol



Espectro 4. Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 300 MHz) de acetato de cacalol

RTH-
1H-A
CDCl
300 I

H-12

H-4

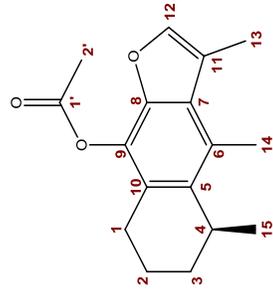
H-1

H-14

H-2', 13'

H-1,2

H-15



11.4

0.86

1.06

3.25

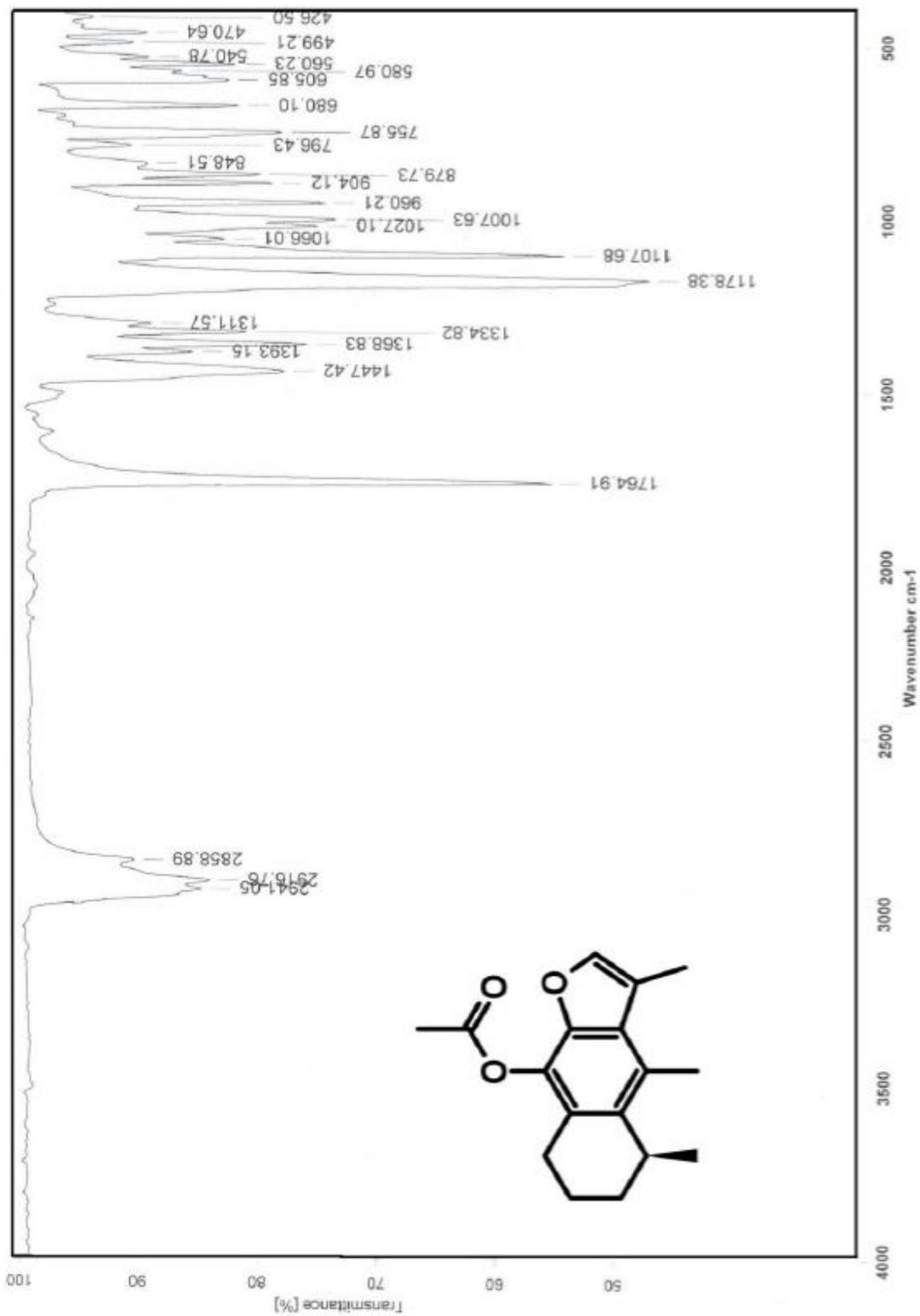
6.00

2.68

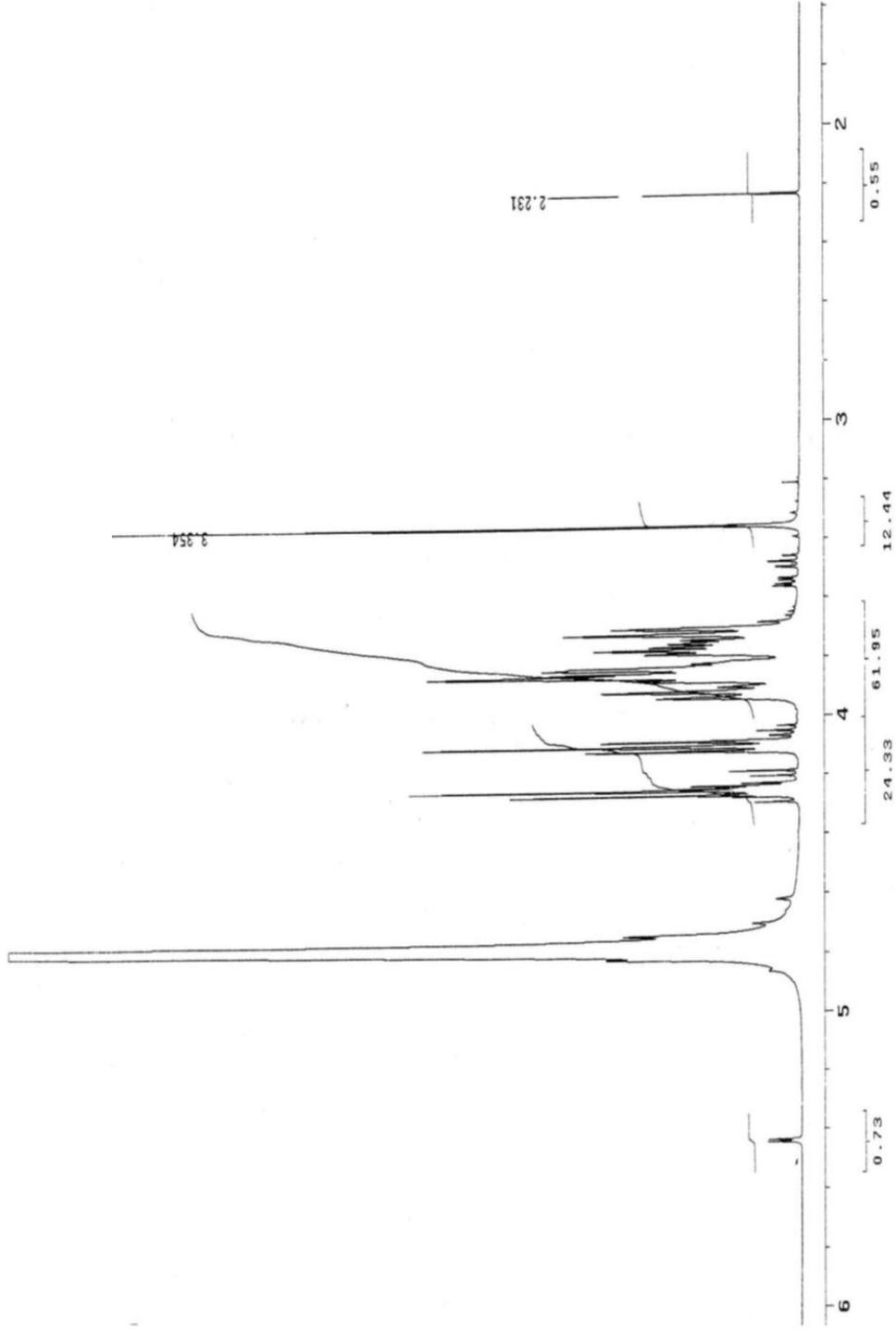
3.25

5 7.4 7.3 7.2 7.1 7.0 6.9 3.6 3.5 3.4 3.3 3.2 3.1 3.0 2.9 2.8 2.7 2.6 2.5 2.4 2.3 2.2 2.1 2.0 1.9 1.8 1.7 1.6 1.5 1.4 1.3 1.2 1.1 1.0 0.9
f1 (ppm)

Espectro 5. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 300 MHz) de acetato de cacalol



Espectro 6. Espectro de IR (CHCl_3 , disolución) de acetato de cacalol



Espectro 7. Espectro de ^1H RMN de la fracción rica en FOS