

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

MECANISMO DE ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE 5-O-  
DESMETILNOBILETINA Y DERIVADOS DEL CATALPOL  
EN HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

ESPERANZA BAS INFANTE

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Elisa Marhuenda Requena
- D<sup>a</sup>. Rosario Gil Benso
- D<sup>a</sup>. Juana Benedi González
- D. Michael Heinrich
- D<sup>a</sup>. Rosa M<sup>a</sup> Giner Pons

Va ser dirigida per:

D. José Luis Rios Cañavate

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Carmen Recio Iglesias

©Copyright: Servei de Publicacions

Esperanza Bas Infante

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6949-4

Edita: Universitat de València

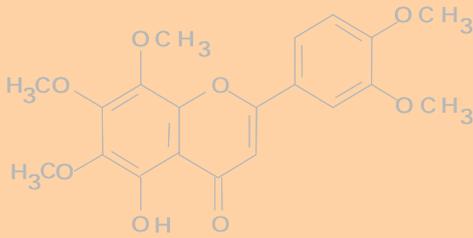
Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

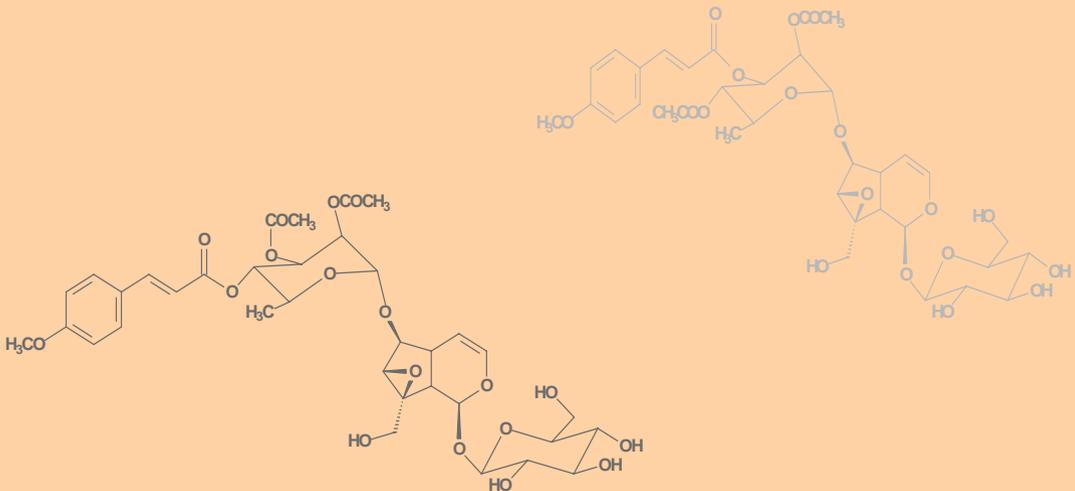
46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



## Mecanismo de acción antiinflamatoria de 5-*O*-desmetilnobiletina y derivados del catalpol en hipersensibilidad retardada





**Mecanismo de acción antiinflamatoria de  
5-O-desmetilnobiletina y derivados del  
catalpol en hipersensibilidad retardada**

Tesis doctoral  
presentada por

**Esperanza Bas Infante**  
Valencia, 2007



**José Luis Ríos Cañavate y María del Carmen Recio Iglesias,**  
Profesores Titulares del Departament de Farmacologia de la  
Universitat de Valencia,

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo presentado por Esperanza Bas Infante, titulado “Mecanismo de acción antiinflamatoria de 5-O-desmetilnobiletina y derivados del catalpol en hipersensibilidad retardada”, ha sido realizado en la Unidad Docente de Farmacognosia y Farmacodinamia del Departament de Farmacología, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Burjassot a uno de marzo de dos mil siete

José Luis Ríos Cañavate

María del Carmen Recio Iglesias

Tras una carrera casi en contra reloj, en la que la mirada sólo apunta hacia un objetivo, finalizar con éxito la tesis, llega el momento de pararse y mirar hacia atrás. Es aquí, en esta paradita en el camino, donde empiezo a recordar con alegría pero con un tinte de nostalgia, cómo me incorporé y cómo ha ido transcurriendo mi vida en este departamento, en el que me he sentido como en casa, la gente tan maravillosa que lo compone y donde he crecido como investigadora. Por ello quiero daros las gracias a todos los que habéis formado parte de esta etapa tan importante en mi vida.

A mis directores, José Luís Ríos y M<sup>a</sup> Carmen Recio, por su gran dedicación, disponibilidad y ayuda. Os estoy especialmente agradecida por dejarme formar parte de este proyecto en el que hemos explorado un nuevo campo en la farmacología, donde hemos aplicado nuevas técnicas, muchas de ellas con éxito, lo cual me ha hecho sentirme realizada como investigadora. Ciertamente es que hubieron momentos de frustración, pero estuvisteis ahí para apoyarme, por todo ello... gracias.

A Rosa Giner y Salvador Máñez por su simpatía y accesibilidad. Por el favor tan grande de ir todas las mañanas a por sangre. ¡Ah! Y por esos preciosos calendarios con los que Salva nos sorprendía todos los años.

A los miembros del tribunal por haber aceptado formar parte de él.

Al Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana por su aportación desinteresada de concentrados sanguíneos.

Al personal de secretaría, especialmente a Mamen, por su amistad y colaboración mostrada desde el primer día.

A los técnicos de laboratorio. A Carlos por estar pendiente de mis amigos roedores y echarme una mano con ellos.

A mis compañeros de laboratorio, por ser amigos y por esos buenos momentos compartidos. A los de la “antigua generación” con los que coincidí en mis primeros pasos en el laboratorio, Luís, Victoriano, Marina, Cecilia y Maite. A los que han pasado por el laboratorio, Silvia, Tommaso, Elisa, a Guillermo por ayudarme a sacar sangre a las ratas y a José María por su ayuda con el HPLC. A la nueva incorporación, Isabel, mucho ánimo. A mis compañeros de grupo, de los que guardo un gran recuerdo y a los que posiblemente no he sabido demostrar mi afecto, Jose y Ana, a Zeng por ser tan risueña. A los del grupo de Diego, de los que nunca me olvidaré y con los que he compartido momentos muy agradables: Almudena, Isabel Barrachina, Nadia, Noureddine e Inma. A los del “otro labo”, a Lara por esos momentos de “Mari” en el laboratorio, por emocionarse con las cosas que le he contado en momentos de felicidad y de angustia, por ser tan sencilla y tan amiga. A Manolo, marido de Lara, que aunque no es del laboratorio me ha mostrado su simpatía y ayuda con el *ladder*, y al precioso hijo que tienen en común, Santiaguín. A Raquel, Isabel Devesa, Marieta, Nicla, Vanessa, M<sup>a</sup> Dolores, Javi y Edu.

A Ana Flores de cultivos celulares por el gran interés mostrado y hacer todo lo posible por ayudarnos con el citómetro.

A todos, muchas gracias.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Educación y Ciencia (SAF2002-00723).

Esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos:

Ríos JL, Bas E, Recio MC. Effects of Natural Products on Contact Dermatitis. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, 2005; 4: 65-80.

Bas E, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Cerdá M, Ríos JL. Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Medica*, 2006; 72: 136-142.

Bas E, Recio MC, Giner RM, Máñez JM, Escandell S, Cerdá M, Ríos JL. New insight on the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scropolioside A. *European journal of pharmacology*, 2007; 555: 199-210

Bas E, Recio MC, Giner RM, Abdallah M, Máñez S, López C, Ríos JL. Inhibition of the pro-inflammatory mediators' production and anti-inflammatory effect of the iridoid scrovalentinoside. *Journal of Ethnopharmacology*, (in press; 2006, doi:10.1016/j.jep.2006.09.038)

Bas E, Recio MC, Giner RM, Máñez S, López C, Gil R, Ríos JL. Demethylnobiletin inhibits delayed-type hypersensitivity reactions, human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Br J Pharmacol.* (enviado)

A mi padre y a mi madre, Jose Antonio y Esperanza,  
a mi hermano, Jose Manuel

A Vicente

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	5
II.1. INTRODUCCIÓN.....	5
II.2. HIPERSENSIBILIDAD .....	7
II.2.1. Tipos de hipersensibilidad .....	8
II.2.2. Dermatitis por contacto .....	11
A. Mecanismo .....	13
B. Tipo de células implicadas.....	14
C. Mediadores.....	21
II.3. IRIDOIDES .....	30
II.3.1. Introducción .....	30
II.3.2. Actividad farmacológica.....	33
A. Actividad sobre el aparato cardiovascular y sangre .....	33
B. Actividad hepatoprotectora.....	34
C. Actividad neuroprotectora.....	34
D. Actividad antiinflamatoria.....	38
E. Otras actividades.....	38
II.4. FLAVONOIDES.....	39
II.4.1. Introducción .....	39
II.4.2. Polimetoxiflavonas.....	40
II.4.2. Actividad farmacológica.....	42
A. Introducción.....	42
B. Efecto sobre la actividad de las cinasas.....	43
C. Efecto sobre la actividad de la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	44
D. Efecto sobre las enzimas COX y LOX.....	45
E. Efecto sobre las enzimas inducibles COX-2 e iNOS.....	48
F. Efecto sobre los factores de transcripción.....	49
G. Efecto sobre la actividad de las proteasa: elastasa y desgranulación de neutrófilos.....	51
H. Efecto sobre la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión celular .....	53
I. Efecto sobre la proliferación celular. Profilaxis contra el cáncer e inducción de apoptosis .....	54

---

<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	61
III.1. COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO.....	64
III.1.1. Flavonoide.....	61
III.1.2. Iridoides.....	61
III.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i> .....	62
III.2.1. Animales de experimentación .....	62
III.2.2. Aparatos y material de laboratorio.....	63
III.2.3. Reactivos.....	64
III.2.4. Tampones .....	65
III.3. MÉTODOS <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i> .....	65
III.3.1. Hipersensibilidad por contacto inducida por dinitrofluorobenceno (DNFB) .....	65
III.3.2. Hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona .....	67
III.3.3. Hipersensibilidad retardada inducida por eritrocitos de cordero (SRBC).....	69
III.3.4. Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de 13- acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).....	70
III.3.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) .....	72
III.3.6. Edema inducido por carragenina en pata de ratón .....	75
III.3.7. Edema inducido por fosfolipasa A <sub>2</sub> en pata de ratón .....	76
III.4. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	79
III.4.1. Células .....	79
III.4.2. Aparatos y material de laboratorio.....	79
III.4.3. Reactivos.....	82
III.4.4. Fases móviles para HPLC .....	84
III.4.5. Disoluciones.....	85
III.4.6. Tampones .....	86
III.4.7. Geles.....	89
III.5. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> .....	90
III.5.1. Obtención de células.....	90
A. Obtención de neutrófilos de rata.....	90
B. Obtención de neutrófilos humanos .....	91
C. Obtención de plaquetas de rata .....	92
D. Obtención de linfocitos humanos.....	93

---

III.5.2. Ensayos de citotoxicidad .....	95
III.5.3. Ensayos de liberación / actividad elastasa .....	97
III.5.4. Efecto sobre la actividad de la 5-LOX en PMNs de rata .....	101
A. Ensayo en células entera .....	101
B. Ensayo en homogenado celular .....	102
III.5.5. Efecto sobre la actividad COX-1 y 12-LOX en plaquetas de rata .....	105
III.5.6. Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos (RAW 264.7) .....	107
III.5.7. Efecto sobre la actividad COX-2 en RAW 264.7 .....	109
III.5.8. Inhibición de la expresión iNOS y COX-2 en RAW 264.7 ..	111
A. Tratamiento y estimulación de macrófagos .....	111
B. Cuantificación de proteínas .....	112
C. Western blotting .....	112
III.5.9. Ensayo de movilidad electroforética en RAW 264.7 .....	116
III.5.10. Inhibición de la proliferación linfocitaria .....	117
III.5.11. Efecto sobre el ciclo celular en linfocitos humanos .....	120
A. Ensayo en función de la concentración de los productos .	122
B. Ensayo en función del tiempo .....	124
III.5.12. Efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-10 en linfocitos humanos .....	125
III.5.13. Efecto sobre la inducción de apoptosis .....	127
A. Análisis de la ruptura del ADN o <i>ladder</i> .....	128
B. Ensayo de apoptosis anexina V-FITC .....	133
C. Efecto sobre la actividad caspasa-3 .....	136
III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	138
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>141</b>
IV.1. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA <i>IN VIVO</i> Y <i>EX VIVO</i> .....	141
IV.1.1. Hipersensibilidad por contacto inducida por DNFB .....	141
IV.1.2. Hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona ...	144
IV.1.3. Hipersensibilidad retardada inducida por eritrocitos de cordero (SRBC) .....	150
IV.1.4. Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA .....	157
IV.1.5. Determinación de la actividad MPO .....	157

---

IV.1.6. Edema inducido por carragenina en pata de ratón.....	160
IV.1.7. Edema inducido por PLA <sub>2</sub> en pata de ratón .....	161
IV.2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	162
IV.2.1. Ensayos de citotoxicidad.....	162
IV.2.2. Ensayos de liberación / actividad elastasa.....	162
IV.2.3. Efecto sobre la actividad de la 5-LOX en PMNs de rata .....	164
IV.2.4. Efecto sobre la actividad COX-1 y 12-LOX en plaquetas de rata .....	166
IV.2.5. Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos (RAW 264.7).....	169
IV.2.6. Efecto sobre la actividad COX-2 en RAW 264.7.....	171
IV.2.7. Inhibición de la expresión iNOS y COX-2 en RAW 264.7 ..	173
IV.2.8. Ensayo de EMSA en macrófagos RAW 264.7 .....	175
IV.2.9. Inhibición de la proliferación linfocitaria .....	176
IV.2.10. Efecto sobre el ciclo celular en linfocitos humanos .....	178
IV.2.11. Efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-10 en linfocitos humanos .....	185
IV.2.12. Efecto sobre la inducción de apoptosis en linfocitos humanos.....	196
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>201</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>221</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>223</b>

---

**Abreviaturas**

AA	ácido araquidónico
Ac-DEVD-AMC	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, sustrato de la caspasa-3
Ac-DEVD-CHO	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO, inhibidor de la caspasa-3
ACD	dermatitis por contacto alérgica
AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
AP-1	activador de proteína- 1
APC	células presentadoras del antígeno
BOC	<i>N</i> -terbutoxicarbonil-L-alanina- <i>p</i> -nitrofenil éster
CD	<i>clusters</i> o grupos de diferenciación
CHX	cicloheximida
CI <sub>50</sub>	concentración inhibitoria 50
COX	ciclooxigenasa
csp.	cantidad suficiente para
DC	células dendríticas
DMEM	medio Eagle modificado por Dubelcco
DMN	5- <i>O</i> -desmetilnobiletina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNCB	dinitroclorobenceno
DNFB	dinitrofluorobenceno
dNTP	deoxirribonucleósido trifosfato
DXM	dexametasona
ECA	enzima convertidora de la angiotensina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EIA	inmunoensayo enzimático
ELISA	inmunoensayo ligado a enzima
EYTA	ácido 5, 8, 11, 14- eicosatetraenoico

FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	<i>N</i> -formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HBSS	solución de Hanks
5-HETE	ácido 5- hidroxieicosatetranóico
12-HETE	ácido 12- hidroxieicosatetranóico
15-HETE	ácido 15- hidroxieicosatetranóico
12-HHTrE	ácido 12- hidroxihéptadecatrienóico
HLA	antígenos leucocitarios humanos
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular- 1
ICE	enzima convertidora de IL-1 $\beta$
id	intradérmico
ip.	intraperitoneal
IFN- $\gamma$	interferón gamma
Ig	inmunoglobulina
IKK	I $\kappa$ B cinasa
IL-	interleucina
JAK	janus cinasa
KC	queratinocitos
LAK	células activadas con linfocinas
LC	células de Langerhans
LT	leucotrieno
LTB <sub>4</sub> R	receptor de leucotrieno B <sub>4</sub>
5-LOX	5-lipoxigenasa
LPS	lipopolisacárido

---

MAPK	PK mitógeno activadora
MeOH	metanol
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	metaloproteinasa
MPO	mieloperoxidasa
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NDGA	ácido nordihidroguaiarérico
NED	<i>N</i> -1-naftiletilendiamina
NF- $\kappa$ B	factor de transcripción nuclear $\kappa$ B
NK	<i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasasa
OXZ	oxazolona
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	tampón fosfato salino
PG	prostaglandina
PHA	fitohemaglutinina
PK	proteína cinasa
PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMN	polimorfonucleares
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
RNAasa	ribonucleasa
ROS	especies radicalarias oxigenadas
RP	fase reversa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sc.	subcutáneo

SC	escropoliósido A
SCSIE	servicio central de soporte a la investigación experimental
SEM	error estándar de la media
SFB	suero fetal bovino
SRBC	eritrocitos de cordero
STAT1	transductores de señal y activadores de transcripción 1
SV	escrovalentinósido
TAE	tampón Tris acetato- EDTA
TBE	tampón Tris borato- EDTA
TCR	receptor de la célula T
TE	tampón Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina
TFA	ácido trifluoroacético
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$
TNF- $\beta$	linfotoxina
TPA	acetato de tetradecanoilforbol
TX	tromboxano
VCAM-1	molécula de adhesión vascular- 1
vo.	vía oral
zVAD.fmk	N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

# I. INTRODUCCIÓN

Son muchas las patologías dermatológicas que cursan con inflamación. Entre las más comunes se pueden considerar las alteraciones relacionadas con la modificación de la respuesta inmunitaria, como pueden ser los trastornos alérgicos debidos a fenómenos de hipersensibilidad o bien a procesos autoinmunes, entre los que destacan patologías como psoriasis, vitíligo y dermatitis atópica. El creciente auge de la fitoterapia ha permitido el empleo de extractos de plantas medicinales en el tratamiento de diferentes patologías de la piel, unas veces como excipientes emolientes o demulcentes incluidos en formulaciones farmacéuticas, y otras aportando directamente sustancias farmacológicamente activas, como el empleo de *Polypodium leucotomos* en psoriasis [Padilla *et al.*, 1974], de *Aloe vera* en diversas afecciones de la piel [Mantle *et al.*, 2001] o *Centella asiatica* como cicatrizante [Brinkhaus *et al.*, 2000]. Las plantas medicinales son fuente de compuestos antioxidantes e inmunomoduladores, que frecuentemente condicionan la respuesta inmunitaria del individuo. También son fuente de sustancias específicas que interfieren con complejos enzimáticos, cuya sobreestimulación o sobreexpresión hace que se modifiquen los procesos enzimáticos relacionados con diversas patologías de la piel, como es el caso de la 5-lipoxigenasa (5-LOX), la ciclooxigenasa (COX) o la óxido nítrico sintasa (NOS).

Debido al interés de las plantas medicinales como fuente de sustancias activas frente a procesos inflamatorios, nuestro grupo de

investigación inició hace tiempo el estudio de extractos de *Sideritis tragoriganum* y *Scrophularia auriculata*, especies utilizadas en medicina popular en diversos trastornos dermatológicos que cursan con inflamación, siendo de gran efectividad en procesos de tipo alérgico [Peris *et al.*, 2001]. Estas especies fueron seleccionadas en un cribado previo de actividad antiinflamatoria, en el cual se demostró el potencial de ambas [Villar *et al.*, 1984; Ríos *et al.*, 1991].

*Sideritis tragoriganum* Lag., conocida popularmente con el nombre de rabo de gato o zahareña en diversas zonas de la cuenca mediterránea, es utilizada popularmente para el tratamiento de procesos inflamatorios junto a otras especies del mismo género [Peris *et al.*, 2001]. De la subespecie *S. tragoriganum* sp. *mugronensis* Borja nuestro grupo de investigación aisló la flavona 5-O-desmetilnobiletina, compuesto común presente también en diversas especies de *Citrus*, y que Manthey *et al.* (1999) ha descrito como potencial agente antiinflamatorio cuyo mecanismo de acción podría estar relacionado con la inhibición de la producción de TNF $\alpha$ . Estudios previos realizados con 5-O-desmetilnobiletina y su derivado 5-metilado han demostrado su efecto moderado como inhibidor de la expresión de iNOS y COX-2 [Mukarami *et al.*, 2003], así como de la producción de PGE $_2$  [Ishiwa *et al.*, 2000] y de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  [Lin *et al.*, 2003] en diferentes líneas celulares.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios previos con el extracto metanólico de *Scrophularia auriculata* L. ssp. *pseudoauriculata* (Seen) Bolòs et Vigo (*S. valentina* Rouy), se procedió al aislamiento,

identificación y estudio de la actividad antiinflamatoria de los potenciales principios activos, aislándose dos saponinas que fueron identificadas como verbascosaponina y verbascosaponina A, responsables fundamentalmente de la actividad antiinflamatoria del extracto, y dos iridoides identificados como escropoliósido A y escrovalentinósido, que fueron más efectivos en las reacciones de hipersensibilidad [Giner *et al.*, 1998; Giner *et al.*, 2000].

Conocer el mecanismo de acción específico de productos naturales avala por un lado el empleo de la medicina popular y/o la fitoterapia, y por otro lado permite examinar nuevas estructuras que pudieran servir de cabeza de serie para futuros fármacos. Por ello, tras haber realizado una revisión bibliográfica sobre los productos naturales activos en procesos de hipersensibilidad mediados por linfocitos T y analizado los diferentes métodos utilizados, se planteó como objetivo de la presente tesis doctoral el estudio de las acciones a nivel celular de 5-O-desmetilnobiletina, escropoliósido A y escrovalentinósido, utilizando procedimientos bioquímicos y moleculares que corroboren sus propiedades antialérgicas y antiinflamatorias.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Introducción

La dermatitis alérgica por contacto es un tipo de hipersensibilidad retardada en la cual existe una fase previa de sensibilización, debido a la exposición tópica del individuo a un alérgeno, de forma que es capaz de inducir una respuesta inmune, y posteriormente una fase de resolución, cuando éste entra de nuevo en contacto con el mismo alérgeno. Las células epidermales de Langerhans así como otras células cutáneas dendríticas transportan el alérgeno desde la piel hasta los nódulos linfoides donde es presentado a las células T. Previamente, el antígeno debe ser procesado en pequeños péptidos por las células presentadoras de antígeno, como son las células dendríticas, los macrófagos y los monocitos. La epidermis es una fuente rica de citocinas, algunas de ellas se expresan constitutivamente mientras que otras necesitan del estímulo apropiado para ser inducidas. Las citocinas liberadas en la epidermis que juegan un papel más relevante en la movilización de las células de Langerhans son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-18, y en la maduración el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Algunas citocinas son liberadas por linfocitos Th1 y Th2, mientras que otras están asociadas con uno de ellos [Wang *et al.*, 2000; Kimber *et al.*, 2002b]. En la piel se encuentran distintos tipos de células como queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales capaces de sintetizar óxido nítrico (NO) el cual tiene un papel relevante en la dermatitis por

contacto, ayudando a la respuesta inflamatoria en los tejidos implicados [Ross *et al.*, 2001].

Un producto natural puede actuar directamente como alérgeno o, en algunos casos sufre una modificación estructural después de su metabolismo, la cual le confiere la capacidad de actuar como un alérgeno. Existen numerosas plantas que pueden producir dermatitis alérgica por contacto, y aunque no es frecuente, en algunos casos la reacción puede ser grave. La característica más interesante es el hecho de que algunas de estas plantas medicinales que producen reacciones alérgicas son usadas específicamente como antiinflamatorias y en algunos casos poseen propiedades antialérgicas. Entre las especies más relevantes cabe destacar *Aloe vera*, que puede desencadenar dermatitis después de su aplicación tópica o la especie *Boswellia serrata*, empleada en desórdenes de la piel como la psoriasis, donde la 5-lipoxigenasa (5-LOX) se encuentra sobreexpresada, sin embargo, se han descrito casos de dermatitis alérgica tras la aplicación del incienso obtenido a partir de sus especies botánicas. El aceite de cade, un componente de preparaciones usadas en el tratamiento de la psoriasis, es al mismo tiempo irritante y alérgica. *Inula viscosa* y otras Asteráceas utilizadas en medicina popular como antiinflamatorias pueden ser la causa de dermatitis alérgica, producida por su contenido en lactonas sesquiterpénicas, a las cuales se les atribuye propiedades antiinflamatorias [Rios *et al.*, 2005].

Algunas plantas con flavonoides son empleadas como antialérgicas, y especies que poseen iridooides o terpenoides han sido descritas como

inhibidoras de las reacciones de hipersensibilidad retardada. *Scrophularia auriculata* [Giner *et al.*, 2000], *Santolina chamaecyparissus* [Sala *et al.*, 2000], *Ranunculus sceleratus* [Prieto *et al.*, 2003], *Helichrysum italicum* [Sala *et al.*, 2003] y el hongo *Poria cocos* [Cuéllar *et al.*, 1997] han mostrado actividad en diferentes protocolos experimentales de hipersensibilidad retardada, lo cual justifica el uso de estas plantas medicinales como antialérgicas.

El cobaya es el animal de experimentación ideal para el estudio de dermatitis alérgica por contacto producida por diversos agentes así como los fármacos potencialmente inhibidores de la reacción, sin embargo, recientemente el ratón ha sido incluido como un animal válido para el análisis del efecto de los fármacos tras inducir la reacción alérgica. El test del incremento de espesor de la oreja de ratón resulta sencillo para el estudio de antagonistas o inhibidores de la reacción. Otros parámetros pueden ser medidos en las orejas como actividad enzimática, mediadores proinflamatorios, infiltración celular y daño tisular. Cloruro picrilo, oxazolona (OXZ), dinitroclorobenceno (DNCB), dinitrofluorobenceno (DNFB) y eritrocitos de cordero (SRBC) son los agentes comúnmente usados en el estudio de agentes potencialmente activos en las reacciones de hipersensibilidad retardada [Rios *et al.* 2005].

## II.2. Hipersensibilidad

La hipersensibilidad es una respuesta inmunitaria exagerada que provoca lesión tisular y se manifiesta en el individuo tras posteriores contactos con el antígeno. Las reacciones de hipersensibilidad pueden originar respuestas de tipo humoral o celular en función del tipo de

alergeno y de su reconocimiento. Existen cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad, de ellas las tres primeras están mediadas por anticuerpos (humoral) y la cuarta por células T (celular) [Celada, 1994; Abbas, 2002].

### II.2.1. Tipos de hipersensibilidad

Existen 4 tipos o reacciones de hipersensibilidad, denominadas I a IV, y se caracterizan por el tiempo de aparición de la respuesta, por tipo de célula o mediadores implicados.

- **Tipo I o hipersensibilidad inmediata**

En las reacciones de hipersensibilidad tipo I el organismo reacciona frente a alergenios solubles mediante una respuesta mediada por Inmunoglobulina (Ig) E, en una reacción que se desarrolla en segundos o minutos. En el primer contacto, los linfocitos B producen una IgE específica contra el alergenio una vez activados por células Th<sub>2</sub>, que liberan IL-4 y provocan el cambio de isotipo. La IgE liberada se une a receptores de tipo FcεR en la superficie de los mastocitos. Una segunda exposición al alergenio provoca el entrecruzamiento de los receptores y la activación del mastocito, que sintetiza y libera histamina, proteasas, prostaglandinas (PGs) y leucotrienos (LTs). Además liberan quimiocinas, IL-3, IL-4 y TNF-α, que reclutan células T, mastocitos y eosinófilos en el lugar de depósito del alergenio. Es la más común y el ejemplo más conocido es la rinitis alérgica estacional.

▪ **Tipo II o reacción de hipersensibilidad citotóxica**

Las reacciones de tipo II son respuestas autoinmunes, como la anemia hemolítica y reacciones frente a células foráneas como la incompatibilidad de grupos sanguíneos. En este tipo, el alérgeno se une a células donde es reconocido por anticuerpos de tipo IgG o IgM. Estos anticuerpos activan el complemento y estimulan las reacciones mediadas por el receptor de Fc, como son la fagocitosis y la citotoxicidad mediada por células y activada por anticuerpos.

▪ **Tipo III o reacción de hipersensibilidad por inmunocomplejos**

La hipersensibilidad tipo III tiene aspectos en común con la de tipo I, de la que se diferencia por los anticuerpos que intervienen. La reacción se desencadena por la unión de antígenos solubles con anticuerpos de tipo IgG, que sólo puede formar complejos que se unen con baja afinidad al Fc $\gamma$ RIII. La reacción de Arthus es un tipo de hipersensibilidad de tipo III localizada. La artritis y la glomerulonefritis surgen como complicaciones después de una infección y son ejemplos de reacciones de tipo III generalizadas.

▪ **Tipo IV o reacción de hipersensibilidad retardada**

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV tardan más de 12 horas en manifestarse, y en ellas están implicadas reacciones inmunitarias mediadas por células, sin intervención alguna de reacciones humoral. Sin embargo, en la actualidad se sabe que hay otras reacciones

de hipersensibilidad que también pueden encajar dentro de esta definición. Por ejemplo, la fase tardía de las reacciones mediadas por IgE se puede manifestar hasta 12-24 horas después del contacto con el alérgeno. Aunque el mecanismo principal de esta reacción está mediado por las IgE, en ella también intervienen las células colaboradoras.

Las reacciones de hipersensibilidad tipo IV están causadas por las respuestas de las células T, tanto a alérgenos solubles como a antígenos asociados a células. Una nueva exposición a células T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, provoca la reacción de hipersensibilidad retardada, causando lesión tisular debida a las citocinas proinflamatorias liberadas por las células CD4<sup>+</sup> o a lesiones tisulares provocadas por las células CD8<sup>+</sup>. Hay tres tipos de hipersensibilidad retardada: por contacto, tuberculínica y granulomatosa. La hipersensibilidad por contacto y la de tipo tuberculínico se manifiestan durante las 72 horas posteriores a la exposición del antígeno. En la dermatitis por contacto el ejemplo más conocido es la alergia causada por metales como el níquel. Las reacciones granulomatosas tardan entre 21 y 28 días en manifestarse; los granulomas se forman como consecuencia de la agregación y proliferación de los macrófagos, y la reacción se puede prolongar varias semanas.

Los tres tipos de hipersensibilidad retardada se diferencian según la reacción que se produce al aplicar el antígeno sobre la piel (epicutánea) o al inyectarlo por vía intradérmica. En los animales, la magnitud de la respuesta se suele determinar midiendo el engrosamiento producido en

la piel [Celada, 1994; Ono, 2000; Abbas, 2002; Sebastiani *et al.*, 2002; Roitt *et al.*, 2003].

**Tabla II.1. Tipos de hipersensibilidad**

	TIPO I	TIPO II	TIPO III	TIPO IV
Denominación	Inmediata	Citotóxica	Inmunocomplejos	Retardada
Antígenos	Alergenos solubles	Alergenos unidos a células	Alergenos solubles	Proteína extraña Hapteno-proteína propia
Mediador	Anticuerpos de tipo IgE	Anticuerpos de tipo IgG	Inmunocomplejos	Linfocitos CD4 <sup>+</sup> Linfocitos CD8 <sup>+</sup>
Células / moléculas efectoras	Mastocitos Sustancias vasoactivas	Fagocitos NK ( <i>natural killer</i> ) Receptor Fc Complemento	Fagocitos Inmunocomplejos Complemento	Linfocitos Citocinas inflamatorias
Inducción	2-30 minutos	5- 8 horas	2- 8 horas	24-72 horas
Ejemplo	Rinitis alérgica estacional o polinosis	Anemia hemolítica tras penicilina	Reacción de Arthus	Dermatitis por contacto

## II.2.2. Dermatitis por contacto

La dermatitis por contacto implica inflamación de la piel como consecuencia del contacto con una sustancia irritante o un alérgeno. Se pueden diferenciar dos tipos de dermatitis por contacto: alérgica e irritante. La presente revisión se centrará en la dermatitis alérgica por contacto (ACD, *allergic contact dermatitis*).

La apariencia clínica de la ACD varía dependiendo de la localización y duración. Las erupciones de la fase aguda están caracterizadas por eritema maculo-papular, vesículas o ampollas,

supuración de las lesiones y prurito. En la ACD crónica aparecen lesiones más severas como descamación, encostramiento y fisuras con o sin papulo-vesiculación [Martín, 1999; Besilto, 2000; Schwarz, 2000; Streit *et al.*, 2001; Kimber *et al.*, 2002a]. El tratamiento de la ACD reside en la correcta identificación de la causa y en la instrucción al paciente para evitar el alérgeno responsable. Esto no es siempre posible, por lo que en general hay que recurrir al tratamiento con fármacos. El tratamiento sintomático se basa en el uso de agentes secantes para erupciones que supuran y emolientes para lesiones en la fase crónica de la enfermedad. El prurito puede ser controlado con agentes antipruriginosos tópicos o antihistamínicos orales. No se deben usar antihistamínicos o anestésicos tópicos porque existe riesgo de que estos induzcan una segunda reacción alérgica en la dermis inflamada.

La administración de glucocorticoides y la radiación ultravioleta asociada a psoraleno (UVB o PUVA) es el tratamiento más utilizado. Recientemente se han desarrollado modalidades terapéuticas que incluyen nuevas clases de fármacos como inmunosupresores, inhibidores de la actividad metabólica celular, inhibidores de la adhesión molecular de las células, aplicación en la piel de citocinas reguladoras y neutralización de citocinas proinflamatorias con oligonucleótidos antisentido, anticuerpos anti-citocinas o receptores solubles de citocinas [Martín, 1999; Barnes *et al.*, 2000; Besilto, 2000; Takashima *et al.*, 2000, Trautman *et al.*, 2001].

## A. Mecanismo

La ACD es una forma de hipersensibilidad retardada en la cual se distinguen dos fases, la primera o sensibilización y la posterior o resolución [Celada, 1994; Abbas, 2002]. En la **fase de sensibilización** el alérgeno o hapteno pasa el estrato córneo y llega a la epidermis donde se conjuga con una proteína. Los haptenos no son capaces de estimular por sí solos una respuesta inmune adaptativa y por eso es necesaria una asociación estable con una proteína [Kimber *et al.*, 1999, 2002a; Besilto, 2000; Smith *et al.*, 2000]. Hay sustancias que se comportan como pro-haptenos y necesitan ser metabolizadas, para poder actuar como alérgicas [Askenase, 1999; Kalish, 1999; Kimber *et al.*, 1999; Sieben *et al.*, 2001]. La capacidad de sensibilización de un alérgeno viene dada fundamentalmente por sus propiedades fisicoquímicas [Basketter; 1998]. Las células dendríticas (DC, *dendritic cells*) reconocen e internalizan al antígeno y lo transportan por los vasos linfáticos vía aferente, hasta el ganglio linfático secundario donde es presentado a los linfocitos T.

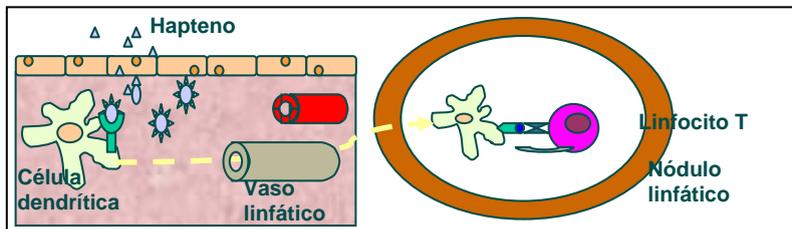


Fig II.1. Fase de sensibilización

Cuando la piel es expuesta de nuevo al mismo alérgeno se desencadena la respuesta inmune o **fase de resolución**, que se caracteriza

por la infiltración de linfocitos T en la zona de la piel expuesta y en el desarrollo de la inflamación cutánea [Kalish *et al.*, 1999, 1999; Kimber *et al.*, 2002a; Guermonprez *et al.*, 2002; Fuchus *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2002]. La resolución de la ACD es dosis-dependiente y puede estar influenciada por gran variedad de factores como el número, tiempo y duración de las exposiciones, irritación de la piel, el vehículo en el que se aplica el alérgeno y el uso de agentes oclusivos [Scott *et al.*, 2002].

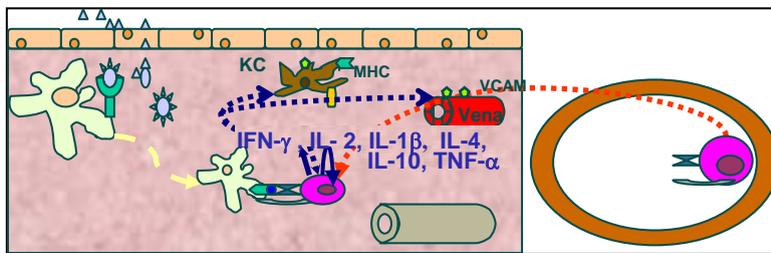


Fig II.2. Fase de resolución

## B. Células implicadas

**Células presentadoras de antígeno.** La activación de las células T por el antígeno requiere la participación de otras células, denominadas células presentadoras del antígeno (APC). Las APC desempeñan una función co-estimuladora en la activación de los linfocitos T. Esta función se ejecuta a través de estímulos proporcionados por moléculas de la superficie de las APC (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) o moléculas solubles secretadas por éstas, que proporcionan la segunda señal (además de la del antígeno), necesaria para la completa activación de los linfocitos T. Los linfocitos T requieren dos señales para la activación, la primera proporcionada a través del receptor de la célula T

(TCR) y la segunda o señal coestimuladora mediante las moléculas secretadas por las APC. La importancia del MHC reside en que las células T específicas de un antígeno no lo reconocen en forma soluble, sino que reconocen fragmentos peptídicos procedentes del antígeno que están unidos de forma no covalente a las moléculas MHC. Cada linfocito T maduro reconoce específicamente el complejo formado por un péptido antigénico foráneo y una molécula MHC propia. En función del tipo de MHC que se expresa en la superficie celular, las APC se pueden clasificar en:

- APC asociadas a MHC I: todas las células nucleadas del organismo
- APC asociadas a MHC II: incluyen macrófagos, linfocitos B, células del endotelio vascular, células epiteliales y células dendríticas, siendo estas últimas las células presentadoras profesionales por excelencia [Abbas, 2002; Guermonprez *et al.*, 2002].

El tipo de asociación entre una célula T y una molécula MHC I o MHC II define la clase de linfocito T que se activa en respuesta a las distintas formas de antígeno, ya que la biosíntesis y ensamblaje de las moléculas MHC I y II determinan el origen de los péptidos que se presentan sobre cada uno de ellos. De manera que los péptidos generados en endosomas o lisosomas a partir de antígenos fagocitados, se unen a moléculas MHC II, por ejemplo los antígenos leucocitarios humanos (HLA, *human leukocyte antigen*)-DR, -DP, -DQ, y son

presentados a las células T CD4<sup>+</sup>. Los péptidos generados en el citosol a partir de proteínas endógenas se asocian a moléculas MHC I, por ejemplo HLA-A, -B, -C, y son presentadas a las células T CD8<sup>+</sup> [Celada, 1994; Kalish *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Guermonprez *et al.*, 2002].

**Tabla II.2. Tipos de APC asociados a MHCII y sus principales características**

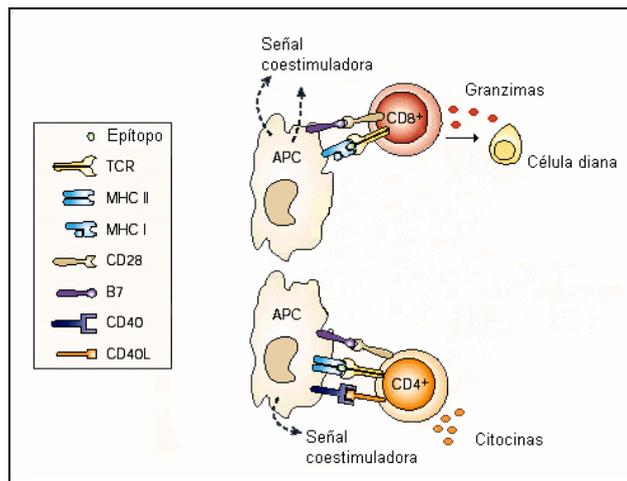
<b>Tipo Celular</b>	<b>Expresión de MHC II</b>	<b>Expresión de coestimuladores</b>	<b>Principales funciones</b>
<b>Células dendríticas</b>	Constitutiva	Constitutiva	Iniciación de las respuestas de CD4 <sup>+</sup>
<b>Macrófagos</b>	Inducible por interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Inducible por LPS, CD40L, IFN- $\gamma$	Desarrollo de CD4 <sup>+</sup> efectores
<b>Linfocitos B</b>	Constitutiva	Inducible por linfocitos T	Estimulación de CD4 <sup>+</sup> en la respuesta humoral
<b>Endotelio vascular</b>	Inducible por IFN- $\gamma$	Constitutiva	Reclutamiento de CD4 <sup>+</sup> específicos Rechazo de injertos?
<b>Células epiteliales</b>	Inducible por IFN- $\gamma$	Probablemente no	Potenciación de reacciones autoinmunes en tejidos?

**Tabla II.3. Rutas de procesamiento y presentación de antígenos**

<b>MHC II</b>	<b>MHC I</b>
Endocitosis de proteínas vírgenes desde el medio extracelular	Síntesis de antígenos proteicos en el citosol
Procesamiento del antígeno en endosomas ácidos o lisosomas, generando fragmentos peptídicos	Degradación de proteínas citosólicas generando fragmentos peptídicos
Unión de los péptidos a moléculas MHC II en una forma especializada de vesícula endocítica	Transporte de péptidos al retículo endoplásmico y ensamblaje de complejos péptido-molécula MHC I
Expresión en superficie de complejos péptido-molécula MHC II	Expresión en superficie de complejos péptido-molécula MHC I
Reconocimiento de los complejos por linfocitos CD4 <sup>+</sup> específicos para el péptido y la molécula MHC II	Reconocimiento de los complejos por linfocitos CD8 <sup>+</sup> específicos para el péptido y la molécula MHC I

Las células dendríticas se localizan en la mayoría de los tejidos periféricos, principalmente en zonas que están en contacto con el medio ambiente como son piel y mucosas. En ausencia de estímulos o respuestas inflamatorias, las DC se encuentran constitutivamente en la sangre, tejidos periféricos, linfa y órganos secundarios linfoides. En los tejidos periféricos, las DC capturan antígenos propios y foráneos, los internalizan y los procesan mediante proteólisis en péptidos más pequeños. Estos péptidos serán presentados mediante las moléculas MHC I y II a las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente. El proceso de tomar el antígeno, degradarlo y ensamblarlo en las moléculas MHC se conoce como presentación del antígeno. Sin embargo, las DC periféricas presentan el antígeno de forma ineficaz, es necesaria una señal externa como pueden ser citocinas pro-inflamatorias para inducir la maduración

de las DC transformándolas en APC eficientes y activadoras de los linfocitos T [Guermonprez *et al.*, 2002]. En la piel se encuentran las células de Langerhans (LC, *Langerhans cells*), que son las APCs más importantes en la hipersensibilidad por contacto [Kimber *et al.*, 1999]. Las LC expresan en su superficie las moléculas CD1 y MHC II, así como receptores para Fc y el complemento. Las moléculas CD1 presentan antígenos no peptídicos a algunas células T sobre la superficie de las DC, células T y B [Celada, 1994; Kimber *et al.*, 2002a y 2002b, Dearman *et al.*, 2002; Roitt *et al.*, 1993].



**Fig II.3. Interacción entre una APC MHC I- linfocito T CD8<sup>+</sup> y entre una APC MHC II- linfocito T CD4<sup>+</sup>**

**Células T.** La hipersensibilidad retardada es una reacción mediada principalmente por células T. Hasta hace poco se creía que la ACD era llevada a cabo por células Th1, sin embargo, se ha demostrado recientemente que las células T CD8<sup>+</sup> también están implicadas en el

proceso [Trautman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Whitmore *et al.*, 2001]. La principal diferencia cualitativa entre células T CD4+ y CD8+ es que las CD4+ reconocen antígenos presentados por las moléculas MHC II, mientras que los CD8+ reconocen los antígenos presentados por las MHC I. Además las CD4+ tienden a producir niveles más altos de algunas citocinas, particularmente de aquellas necesarias para la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, como son IL-4 y IL-5 [Askenase, 1999; Kalish *et al.*, 1999]. CD4 y CD8 son moléculas esenciales (coreceptores) para transducir la señal de activación iniciada tras el reconocimiento del complejo MHC-péptido por parte del TCR [Fujisawa *et al.*, 1996]. CD4 y CD8 poseen dominios citoplasmáticos con afinidad para la tirosina cinasa lck. La interacción de CD4 o CD8 con MHC II o MHC I los aproxima al TCR y permite que la tirosina cinasa lck fosforile el residuo de tirosina en los dominios intracelulares (ITAM) de moléculas asociadas al TCR, como CD3 y la cadena  $\zeta$ . La fosforilación de estas proteínas es uno de los primeros pasos que conduce a la activación y posterior respuesta de los linfocitos T [Celada, 1994]. Las respuestas inducidas por la interacción MHC II-célula T CD4+ se pueden resumir en:

- Inducción de la expresión de citocinas y nuevas moléculas en la superficie de las células T CD4+ que inician su expansión clonal y sus funciones efectoras. Así, en función de las citocinas que liberan, los linfocitos T se clasifican en tipo 1 y tipo 2 (linfocitos T CD4+: Th1 y Th2; linfocitos T CD8+: Tc1 y Tc2) [Kalish *et al.*, 1999;

Kimber *et al.*, 2002a y 2002b, Dearman *et al.*, 2002; Lebec *et al.*, 2001].

- Los productos de las células T CD4<sup>+</sup> activadas, como el IFN- $\gamma$ , incrementan la función de las células próximas, amplificando así el número de APC efectivas.
- Las moléculas de superficie de las células T CD4<sup>+</sup> pueden interactuar con receptores en la superficie de linfocitos B y otras APC, por ejemplo CD40- CD40L, provocando la activación de éstos o mejorando su eficacia.

La respuesta inducida por la interacción MHC I-célula CD8<sup>+</sup> puede provocar la lisis de cualquier célula nucleada que presente péptidos foráneos asociados a MHC I. La destrucción de la célula diana puede llevarse a cabo por dos mecanismos distintos:

- Apoptosis por la interacción Fas-FasL (CD95-CD95L)
- Liberación por parte del linfocito citotóxico de moléculas solubles (granzimas) que provocan la apoptosis de la célula diana [Kehren *et al.*, 1999; Kalish *et al.*, 1999; Ritchie *et al.*, 2000; Oberholzer *et al.*, 2001; Abbas, 2002; Guermonprez *et al.*, 2002].

**Queratinocitos.** Los queratinocitos (KC, *keratinocyte cell*) son un tipo de células que se encuentran en la epidermis. En la dermatitis atópica por contacto los queratinocitos sufren apoptosis por la vía de activación del sistema del Fas-FasL [Kehren *et al.*, 1999; Schwarz, 2000; Trautman *et al.*, 2001]. La expresión del Fas en los KC es inducida por la secreción de

IFN- $\gamma$  por las células T. La elevada expresión de IFN- $\gamma$  propaga el proceso inflamatorio mediante la alteración de la barrera epidérmica. En la histología de muestras de lesiones provocadas por ACD se observa que la mayoría de los KC apoptóticos no se encuentran en las zonas con espongiosis, sino en áreas en las que existe una cohesión normal de las células de la epidermis. Es posible que la apoptosis preceda a la espongiosis y que la muerte por apoptosis de los KC promueva la espongiosis por permitir el paso de fluido extracelular hacia la epidermis [Schwarz, 2000].

### C. Mediadores

La epidermis es una fuente rica en citocinas, algunas de ellas se expresan constitutivamente mientras que otras necesitan ser inducidas mediante el estímulo apropiado [Kimber *et al.*, 1999; Guermonprez *et al.*, 2002]. Algunas citocinas son producidas por LC, KC o por los dos tipos de células. Las citocinas de la epidermis que tienen un papel relevante en la movilización de las LC son el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 y en la maduración de las mismas el GM-CSF [Kimber *et al.*, 1999; 2002b, Dearman *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002]. IL-1 $\beta$  es un mediador importante en la iniciación de las respuestas inmunes cutáneas y su regulación por las LC debe representar un paso importante y temprano en la sensibilización de la piel. La expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  puede ser una posible base para una aproximación a la identificación de sustancias sensibilizantes [Kimber *et al.*, 1999]. Además, existen otras

citocinas, como IL-10, que pueden regular la migración de las LC [Kimber *et al.*, 2002a].

Algunas citocinas son producidas tanto por los linfocitos Th1 como por los Th2, mientras que otras están asociadas a uno de los dos tipos. Así, las células Th1 producen IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , mientras que los Th2 liberan preferentemente IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y IL-13 [Lebrec *et al.*, 2001; Kimber *et al.*, 2002a]. Ambos, Th1 y Th2, producen IL-3 y GM-CSF [Lebrec *et al.*, 2001; Abbas, 2002]. Sensibilizantes del tipo oxazolona o DNFB, activan la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos Tc1, los cuales juegan un papel muy importante en las reacciones de inflamación cutánea [Xu *et al.*, 1996]. Sin embargo, el IFN- $\gamma$  no es producido sólo por las células T durante la sensibilización por contacto, porque la eliminación de las células T CD4<sup>+</sup> de los nódulos linfoides mediante el tratamiento de ratones con formaldehído da lugar a una importante disminución en la producción de IFN- $\gamma$  [Dearman *et al.*, 1996].

Se ha observado que el LTB<sub>4</sub> es producido por monocitos y células T activadas y se han propuesto sus funciones inmunorreguladoras, sugiriendo que el LTB<sub>4</sub> está intrínsecamente implicado en la regulación de las respuestas de las células T mediante un efecto directo sobre el receptor del LTB<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>R) de los linfocitos. Se ha demostrado la expresión constitutiva del LTB<sub>4</sub>R tanto en células T activadas como silenciadas. El efecto inmunosupresor de los antagonistas del LTB<sub>4</sub>R es llevado a cabo principalmente por la inhibición de la liberación de IL-2 por linfocitos T así como de la respuesta a la IL liberada, pero no a una

disminución en la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R). Los antagonistas de LTB<sub>4</sub>R también inhiben la producción de IFN- $\gamma$  inducida por el anticuerpo monoclonal CD3 mAB o la producción de IL-12 y IL-4 [Morita *et al.*, 1999].

Las células de la piel son capaces de sintetizar NO en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). La isoforma inducible de la NOS (iNOS) produce suficiente NO como para dañar el tejido [Bruch-Gerharz *et al.*, 1998; Fuchus *et al.*, 2001]. El NO es muy importante en la dermatitis por contacto, causando respuestas inflamatorias en los tejidos implicados; sin embargo los mecanismos por los que el NO actúa en la dermatitis no están claros. Se ha propuesto un modelo de la función del NO, en el que al principio de la etapa de resolución existe una fase inespecífica en la que hay niveles bajos de NO que dan lugar a vasodilatación y atracción de neutrófilos, tras la cual hay una fase específica con niveles elevados de NO que provocan la inhibición de la liberación de mediadores por mastocitos, disminución de la expresión de células de adhesión, interrupción en la atracción de neutrófilos y apoptosis de las células efectoras [Ross *et al.*, 2001]. Los KC activados por la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T, expresan en su superficie moléculas del tipo MHC II, ICAM-1 (*intercellular adhesión molecul-1*, CD54) y Fas. La aplicación de alérgenos en la piel inicia la producción de citocinas por parte de los KC, como el TNF- $\alpha$ . Estas citocinas inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (*vascular adhesión*

*molecule-1*, CD106), promoviendo el reclutamiento de células T de memoria específicas a la piel [Fuchus *et al.*, 2001; Trautman *et al.*, 2000].

**Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .** El TNF- $\alpha$  es sintetizado como una proteína de transmembrana no glicosilada de 25kD. Tras una proteólisis se produce un fragmento de 17 kD que es la forma circulante como homotrímero (51 kD). La principal fuente celular del TNF- $\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados, aunque también puede ser secretado por células T estimuladas por antígenos, células NK (*natural killer*) y mastocitos. Los efectos del TNF- $\alpha$  dependen de la cantidad producida. En bajas concentraciones el TNF- $\alpha$  actúa localmente como un regulador paracrino y autocrino de leucocitos y células endoteliales y tiene los efectos siguientes:

- En las células endoteliales vasculares el TNF- $\alpha$  induce la expresión de selectinas
- Activa neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares
- Estimula los fagocitos mononucleares produciéndose citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , y la familia de la IL-8
- Coestimulador de la activación de los linfocitos T y producción de anticuerpos por los linfocitos B
- Induce la producción de factores de crecimiento por las células endoteliales y los fibroblastos
- Potencia la expresión del MHC I

Si se producen cantidades mayores de TNF- $\alpha$  puede entrar en la sangre actuando como una hormona endocrina y sus acciones principales son [Celada, 1994; Abbas, 2002; Roitt *et al.*, 2003]:

- Fiebre a través de un incremento de la síntesis de PGs al actuar sobre las células del hipotálamo
- Estimular la síntesis de IL-1 y IL-6 en fagocitos mononucleares
- Alterar el sistema de coagulación modificando la actividad procoagulante del endotelio vascular
- Suprimir la división de la célula madre pluripotente de la médula ósea.

**Interferón- $\gamma$  o IFN tipo II.** El IFN- $\gamma$  es una glicoproteína heterodimérica con subunidades de 21 a 24kD, codificadas por el mismo gen. El IFN- $\gamma$  es la principal citocina de activación de los macrófagos y tiene funciones esenciales en la inmunidad innata y en la inmunidad celular específica. Se trata de la citocina característica de la subpoblación Th1 de las células T colaboradoras. Las funciones del IFN- $\gamma$  son las siguientes [Celada, 1994; Abbas, 2002; Roitt *et al.*, 2003]:

- Es la citocina de activación de los macrófagos que proporciona el medio por el que los linfocitos T y las células NK activan a los macrófagos para que destruyan los microorganismos fagocitados. El IFN- $\gamma$  potencia la función microbicida de los macrófagos al estimular la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y NO fagocitados

- Induce la expresión de moléculas de clase I y II del MHC y de coestimuladores en las APC. El IFN- $\gamma$  también es un activador de células endoteliales vasculares y potencia muchas de las acciones del TNF sobre las células endoteliales induciendo la adhesión y extravasación de los linfocitos T a los focos de infección
- Induce la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a la subpoblación Th1 e inhibe la proliferación de la subpoblación Th2
- Actúa sobre las células B favoreciendo el cambio a ciertas subclases de IgG e inhibiendo el cambio a isotipos dependientes de la IL-4
- Activa a neutrófilos y estimula la actividad citolítica de las células NK

**Interleucina-1 $\beta$ .** La célula que produce la mayoría de IL-1, como en el caso del TNF- $\alpha$ , es el fagocito mononuclear estimulado con lipopolisacárido (LPS), TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$  o el contacto con células T CD4<sup>+</sup>. A bajas concentraciones IL-1 ejerce una función inmunoreguladora:

- IL-1, junto con los activadores policlonales, induce la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y el crecimiento y diferenciación de los B.
- Estimula células que funcionan como efectoras de respuestas inmunes o inflamatorias.
- Induce coagulación y adherencia leucocitaria.

En grandes cantidades la IL-1 tiene efectos endocrinos similares a los del TNF- $\alpha$ , produce fiebre, estimula la síntesis de proteínas e induce la pérdida metabólica denominada caquexia. Existe una gran similitud entre las acciones de IL-1 y TNF- $\alpha$ , probablemente porque los receptores para estas dos citocinas realizan la señalización por medio de proteínas homólogas y activan los mismos factores de transcripción. Sin embargo, hay varias diferencias entre la IL-1 y el TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, la IL-1 no induce la muerte por concentraciones sistémicas altas, ni causa shock séptico por sí misma. [Celada, 1994; Abbas, 2002; Roitt *et al.*, 2003]

**Interleucina-2.** La IL-2 es una citocina de 14 a 17 kD codificada por un solo gen. Se trata de un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por el antígeno y es responsable de la expansión clonal de las células T tras el reconocimiento del antígeno. La IL-2 es producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y en menores cantidades por las células T CD8<sup>+</sup>. La activación de las células T por antígenos y coestimuladores estimula la transcripción del gen de la IL-2 y la síntesis y secreción de esta proteína. La producción de la IL-2 es transitoria, con una secreción máxima unas 8 a 12 horas después de la activación. Los efectos principales de esta citocina son:

- Principal responsable de la progresión de las células T desde la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. La IL-2 funciona como un factor de crecimiento autocrino y paracrino. La cantidad de IL-2 sintetizada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> determina la magnitud de la

respuesta inmunitaria. La IL-2 induce la síntesis de más IL-2, IFN- $\gamma$ , y linfoxina (TNF- $\beta$ )

- Estimula el crecimiento de las células NK y aumenta su función citolítica produciendo células activadas con linfoquinas (LAK)
- Induce el crecimiento de los linfocitos B y estimula la síntesis de anticuerpos [Celada, 1994; Abbas, 2002; Roitt *et al.*, 2003]

**Interleucina-4.** La IL-4 tiene un tamaño de 20 kD y es producida sobre todo por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y en menor cantidad por mastocitos y basófilos activados. Esta citocina es el estímulo más importante para la producción de anticuerpos IgE y para el desarrollo de las células Th2 a partir de las células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> vírgenes. La IL-4 es la citocina característica de la subpoblación Th2 y actúa como citocina inductora y efectora de estas células. Los efectos principales de la IL-4 son:

- Es un factor de crecimiento y diferenciación para los linfocitos B. Además, induce el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas a IgE
- Factor de crecimiento autocrino para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subtipo Th2
- Factor de crecimiento para los mastocitos
- Induce en los linfocitos B y en los fagocitos mononucleares la expresión de CD23, que es un receptor de baja afinidad para la porción Fc de la IgE

- Induce la adherencia de las células endoteliales para unir los linfocitos y los monocitos [Celada, 1994; Abbas, 2002; Roitt *et al.*, 2003]

**Interleucina-10.** La IL-10 es un homodímero formado por dos moléculas de 19,5 kD cada una, codificadas por un único gen. Esta citocina es un inhibidor de los macrófagos activados y, por tanto, interviene en el control homeostático de las reacciones de la inmunidad innata y de la inmunidad celular. La IL-10 es producida por células T CD4+ del subtipo Th2 y además por otras células como los linfocitos B, fagocitos mononucleares y queratinocitos. Los efectos biológicos de la IL-10 derivan de su capacidad de inhibir muchas de las funciones de los macrófagos activados. Los macrófagos responden a los microorganismos secretando citocinas y expresando coestimuladores que potencian la activación de células T y la inmunidad celular. La IL-10 actúa sobre los macrófagos activados para finalizar estas respuestas y restablecer el estado de reposo del organismo una vez erradicada la infección microbiana. Las principales funciones de la IL-10 son [Abbas, 2002; Celada, 1994; Roitt *et al.*, 2003]:

- Inhibe la proliferación de los linfocitos T estimulados por el antígeno
- Disminuye la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-3, GM-CSF, TNF- $\alpha$  y LTs pero no la de IL-4
- Sobre las células NK, la IL-10 inhibe la producción de IFN $\gamma$  y aumenta la actividad LAK inducida por la IL-2

- Incrementa la expresión de las moléculas de clase II del MHC y la proliferación de linfocitos B
- Inhibe la síntesis de IgE inducida por la IL-4
- Inhibe en los fagocitos mononucleares la inducción de clase II del MHC mediada por el IFN- $\gamma$  y la producción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y GM-CSF, así como la producción de NO
- Junto con IL-3 y IL-4, es un coestimulador de la proliferación de los mastocitos

## II.3. Iridoides

### II.3.1. Introducción

Los iridoides forman parte de un grupo concreto de metabolitos secundarios de origen vegetal. Desde un punto de vista químico, son monoterpenos basados en un esqueleto ciclopentano[c]piranoide.

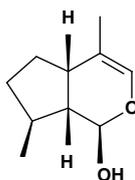
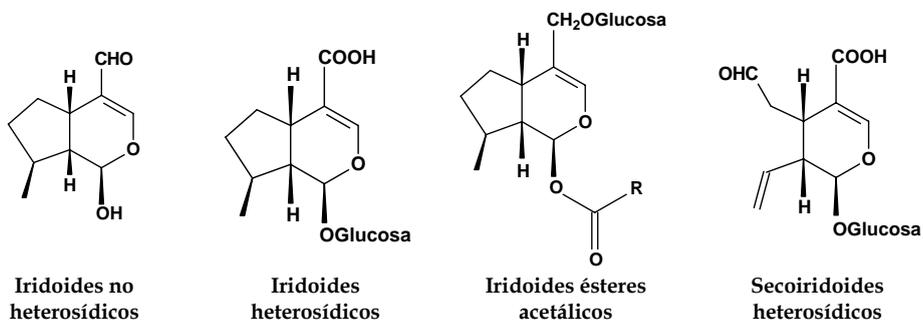


Fig II.4. Esqueleto ciclopentano[c]piranoide

En función de su estructura, los iridoides se clasifican en:

- Iridoides no heterosídicos
- Iridoides heterosídicos
- Iridoides ésteres acetálicos
- Secoiridoides heterosídicos



**Fig II.5. Estructura química de los distintos tipos de iridoides**

Las modificaciones secundarias en la estructura general del iridoide, como epoxidación, hidroxilación y esterificación de los grupos hidroxilo con ácidos aromáticos derivados de la vía del ácido shikímico, llevan a la multiplicidad de compuestos que constituyen cada grupo estructural.

La revisión bibliográfica de la actividad farmacológica se centrará en los iridoides con estructura derivada del catalpol, grupo en el que se ubican los dos compuestos seleccionados para este estudio, escrovalentinósido (6-*O*-(2'',3''-di-*O*-acetyl-4''-*O*-*p*-metoxi-cinamoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil catalpol) y escropoliósido A (6-*O*-(2'',4''-di-*O*-acetyl-3''-*O*-*p*-metoxi-cinamoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil catalpol) obtenidos a partir de *Scrophularia auriculata* sp. *pseudoauriculata* [Giner et al., 1998].



Fig II.6. *Scrophularia auriculata* L. sp. *Pseudoauriculata* (Seen) Bolòs et Vigo (*Scrophularia valentina* Rouy)

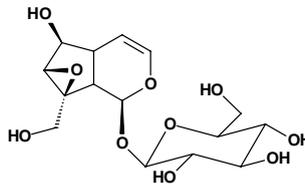
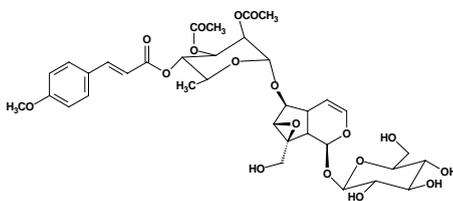
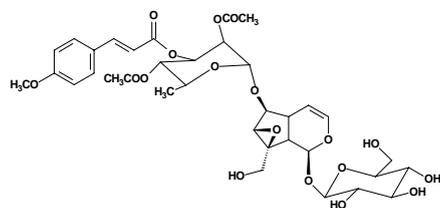


Fig II.7. Estructura del catalpol



Escrovalentinosido



Escropoliósido A

Fig II.8. Estructura de los iridoides escrovalentinosido y escropoliósido A

### II.3.2. Actividad farmacológica

En un principio, los iridoides no fueron considerados una clase de compuestos activos farmacológicamente. Sin embargo, actualmente se reconoce su participación en la actividad que tienen algunas plantas utilizadas en medicina popular, formando parte de compuestos amargos, sedantes, febrífugos, antitusivos, antihipertensivos, cicatrizantes y antiinflamatorios cutáneos [Ghisalberti, 1998].

#### A. Actividad sobre el aparato cardiovascular y sangre

Desde hace tiempo es conocido el efecto beneficioso de las hojas de olivo (*Olea europaea*) en el tratamiento de la hipertensión, habiéndose aislado tres compuestos activos con diferente mecanismo: oleuropeína responsable del efecto hipotensor y vasodilatador coronario, oleaceína inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), y  $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil) etanol, bloqueante de los canales del calcio [Rauwald *et al.*, 1994].

Los iridoides aislados de diferentes especies de *Eremophila* (melampirósido, feruloilajugol, catalpol y verminósido) poseen un inmediato y significativo efecto inotropeo negativo. Además, todos, excepto el catalpol, incrementan el cronotropismo [Pennacchio *et al.*, 1996].

Otros efectos atribuidos a los iridoides incluyen la actividad estimulante del músculo liso y cardiaco de jaranidósido y la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+$  en eritrocitos humanos por catalpol [Ghisalberti, 1998].

### B. Actividad hepatoprotectora

Los iridoides heterósidos como aucubina, catalpol, swertimarina y gardenósido son compuestos habituales en las plantas utilizadas en la medicina tradicional china. De ellos, destaca aucubina por su potente actividad hepatoprotectora frente a la toxicidad producida por tetracloruro de carbono o  $\alpha$ -amanitina. Además, suprime la replicación del ADN del virus de la hepatitis B *in vitro* [Chang, 1998].

Mehrotra *et al.* (1990) comprobaron que Picroliv (una mezcla comercial que contiene los principios mayoritarios de *Picorrhiza kurroa*, picrosido I y kutkósido), el iridoide catalpol, andrografólido (compuesto activo de *Andrographis paniculata*), y silimarina poseen propiedades anti-antígeno del virus de la hepatitis B. Además picroliv también inhibió los antígenos purificados del VHB preparados a partir de portadores sanos.

### C. Actividad neuroprotectora

Una investigación en jerbos sometidos a isquemia cerebral global transitoria y mediante la valoración del comportamiento y evaluación histológica ha demostrado que el iridoide produce protección neuronal. Los autores sugieren el posible uso terapéutico del catalpol en este tipo de isquemias [Li *et al.*, 2004].

Se ha estudiado el efecto de (+)- y (-)-siringaresinol y sus glucósidos, siringina, aucubina y catalpol sobre el crecimiento neuronal de la línea celular PC12h. De ellos, el diglucósido de (+)-siringaresinol y la aucubina parcialmente hidrolizada, fueron los compuestos más

potentes en la promoción del crecimiento neuronal y en la diferenciación de las células PC12h [Yamazaki *et al.*, 1994].

Recientemente, Jiang *et al.* (2004) han establecido el efecto de catalpol sobre la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una línea celular de feocromocitoma de rata (PC 12). Dicho compuesto suprimió la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol, y además atenuó la activación de caspasa-3, el fraccionamiento de PARP y reguló la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de los miembros de la familia de Bcl-2.

#### **D. Actividad antiinflamatoria**

El extracto acuoso obtenido de la raíz de *Harpagophytum procumbens* posee actividad antiinflamatoria dosis-dependiente frente al edema inducido por carragenina, mientras que el glucoiridoide mayoritario presente en el extracto, harpagósido, administrado oralmente a la dosis de 5 y 10 mg/kg, no tuvo efecto antiinflamatorio [Lanhers *et al.*, 1992]. Un estudio posterior de este compuesto llevó a la conclusión de que harpagósido tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas dosis-dependiente en procesos agudos o subagudos si se administra por vía intraperitoneal, pero no por vía oral [Baghdikian *et al.*, 1997].

Recio *et al.*, (1994) estudiaron la relación estructura química-actividad antiinflamatoria de una serie de glucoiridoides frente al edema agudo inducido por tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón y el edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón. En general, se observó que la actividad antiinflamatoria por vía sistémica es modesta,

siendo algunos de ellos más activos tópicamente. Se observó que la hidroxilación en C<sub>5</sub>, la insaturación en C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>, la metilación del carboxilo en C<sub>1</sub> y la integridad del anillo ciclopentano incrementan la actividad, mientras que la hidroxilación en C<sub>8</sub> la disminuye.

Giner *et al.* (1991) estudiaron la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *Scrophularia auriculata* frente al edema inducido por acetato de TPA en oreja de ratón. A partir de dicho extracto se aisló una mezcla de dos iridoides derivados del catalpol, responsables de la actividad. En un trabajo posterior, Giner *et al.* (1998) separaron los dos compuestos, identificándolos como escropoliósido A y un nuevo iridoide, escrovalentinósido. Ambos compuestos demostraron su capacidad antiinflamatoria al inhibir preferentemente la reacción de hipersensibilidad inducida por oxazolona en oreja de ratón [Giner *et al.*, 2000].

Aucubina inhibió la producción de LTC<sub>4</sub> en un ensayo realizado en macrófagos peritoneales de ratón, aunque mostró menos potencia que el fármaco de referencia utilizado, ácido nordihidroguaiarérico (NDGA). Harpagósido y harpágido también inhibieron la producción de LTC<sub>4</sub>, aunque los resultados no fueron significativos. Además, harpagósido y 8-acetilharpagido inhibieron la producción de PGE<sub>2</sub> en macrófagos peritoneales de ratón de un modo no significativo. De los iridoides estudiados, algunos inhibieron la producción de tromboxano (TX)B<sub>2</sub> en plaquetas humanas, aunque sólo harpágido, escrodiósido y escropoliósido B no tuvieron efecto significativo. De estos resultados, los

autores concluyeron que la inhibición selectiva de la liberación de TXB<sub>2</sub> es el principal mecanismo de acción de la mayoría de iridoides, sin afectar a los demás metabolitos de la vía de la COX [Bermejo *et al.*, 2000].

El factor nuclear kappa B (NF-κB) es uno de los principales factores de transcripción en mamíferos y se ha demostrado su papel en la respuesta inmune innata, así como en enfermedades crónicas como la artritis reumatoide. Existen numerosos mediadores que dependen de la activación de este factor, entre los que se encuentran la iNOS y la COX-2 [Bremner *et al.*, 2002]. En este contexto, An *et al.* (2002) demostraron que catalpósido inhibe la traslocación al núcleo de la subunidad p65 del NF-κB así como la liberación y expresión de los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y las interleucinas (IL) 1β y 6 en macrófagos RAW 264.7. En un ensayo llevado a cabo con aucubina y su producto hidrolizado, Park *et al.* (2004) observaron en la misma línea celular que mientras que el producto hidrolizado inhibía el ARNm de TNF-α y la liberación del mediador, la aucubina no tenía efecto. Además, el tratamiento con el hidrolizado bloqueó tanto la degradación del I-κBα como la traslocación del NF-κB del citosol al núcleo. Atish *et al.* (2006) en su revisión describen que aucubina inhibe la producción de TNF-α y IL-6 en la línea celular de mastocitos de rata (RBL)-2H3.

Ju *et al.*, (2003a) demostraron en macrófagos de ratón RAW 264.7 que patridoide II inhibía la expresión de la iNOS y la producción de NO y TNF-α, sin embargo no afectó a la expresión de la COX-2. Nardostachin, en otro trabajo de los mismos autores [Ju *et al.*, 2003b],

inhibió también la expresión de la iNOS y la liberación de los mediadores estudiados. Sin embargo, este producto sí tuvo efecto sobre la COX-2, inhibiendo su expresión, así como la disminución en la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).

### E. Otras actividades

Los iridoides aislados de *Parentucellia latifolia*, peracetatos de penstemonósido, aucubina y catalpol, antagonizaron *in vitro* las contracciones musculares uterinas inducidas por acetilcolina y calcio, de manera similar a como lo hace la papaverina. La actividad antiespasmódica de los tres iridoides está relacionada con el efecto inhibidor del calcio extracelular, intracelular o ambos [Ortiz de Urbina *et al.*, 1994].

Las ADN polimerasas han emergido recientemente como importantes dianas biológicas en el desarrollo de agentes anticancerosos. El efecto inhibitorio observado en experimentos realizados con catalpol no depende de la concentración de ADN. Sin embargo, el aumento en la concentración de deoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) rescata la actividad de la TaqADN polimerasa, sugiriendo que el catalpol actúa competitivamente con el dNTP por el sitio de unión de la enzima [Pungitore *et al.*, 2004].

A menudo, las plantas son atacadas por múltiples seres vivos, incluyendo agentes patógenos y depredadores herbívoros. En un estudio llevado a cabo con aucubina y catalpol, las plantas que contienen estos

compuestos incrementaron la resistencia *in vivo* de la planta frente al insecto herbívoro *Spodoptera exigua* y el patógeno fúngico biotrofo *Diaporthe adunca*. Es sabido que los iridoides son capaces de detener la depredación o el crecimiento de muchos insectos herbívoros en general, pero a veces actúan como indicadores de puesta de huevos de mariposas especializadas y estimulan la depredación por parte de las larvas. En general, las larvas de los parásitos se desarrollan peor en una planta con alto contenido en catalpol [Bowers, 2003; Nieminen *et al.*, 2003; Biere *et al.*, 2004].

## II.4. Flavonoides

### II.4.1. Introducción

Los flavonoides son compuestos fenólicos derivados del 2-fenilcromano, cuya estructura base es el núcleo benzopirano-4-ona con un sustituyente aromático en el carbono 2.

En función de su estructura química los flavonoides se clasifican en flavonas y flavonoles, flavanonas y dihidroflavanoles, isoflavonas, chalconas y auronas, antocianidinas.

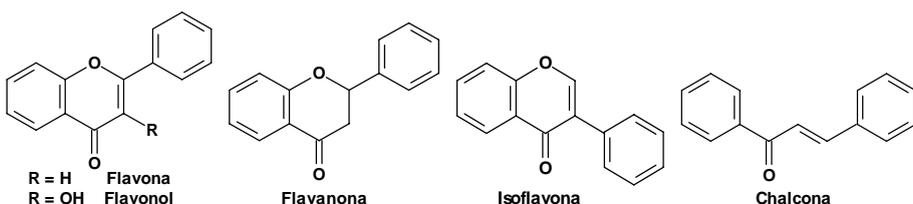


Fig II.9. Estructuras más frecuentes de flavonoides

Los flavonoides son responsables de la coloración de las flores y frutos. También se localizan en la cutícula y en las células epidérmicas de las hojas, de forma que aseguran la protección de los tejidos contra los efectos nocivos de las radiaciones ultravioleta. Cuando los flavonoides se encuentran en la cutícula foliar casi siempre lo hacen como geninas libres cuya lipofilia se incrementa por el grado de metilación de los grupos hidroxilo. Esto ocurre principalmente en plantas de regiones áridas o semiáridas, generalmente provistas de estructuras secretoras [Bruneton, 2000].

### II.4.2. Polimetoxiflavonas

El género *Citrus* (Rutaceae) se caracteriza por acumular compuestos fenólicos como flavanonas y flavonas polimetoxiladas, las cuales son infrecuentes en otros géneros, lo que hace que se les denomine genéricamente citroflavonoides. Las flavonas presentes en los cítricos se pueden encontrar en forma libre (genina) o heterosídica. Existen derivados cuya estructura está altamente sustituida por grupos hidroxilo y/o metoxilo. Se pueden encontrar compuestos como escutelareína (5,6,7,4'-tetrametoxiflavona), sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona) y nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona) [Del Río *et al.*, 2004]. Lamiaceae es una familia taxonómicamente alejada de Rutaceae [Frohne y Jensen, 1998] que contiene diversas especies con polimetoxiflavonas, especialmente las del género *Scutellaria* [Gafner *et al.*, 2003; Miyaichi *et al.*, 2006], aunque

también se han descrito en otros géneros como *Lamium*, *Salvia*, *Teucrium*, *Thymus* [Harborne,1988] y *Sideritis* [Villar *et al.*, 1984; Harborne,1988].

El flavonoide objeto de nuestro estudio es la 5-*O*-desmetilnobiletina (5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona). Se trata de una polimetoxiflavona análoga a la nobiletina pero con un grupo hidroxilo en el carbono 5, aislada a partir de las partes aéreas de *Sideritis tragoriganum* sp. *mugronensis* (Lamiaceae) [Villar *et al.*, 1984].



Fig II.10. *Sideritis tragoriganum* Lag. sp. *mugronensis* (Borja) C. Obón de Castro & D. Ribera Núñez (Lamiaceae)

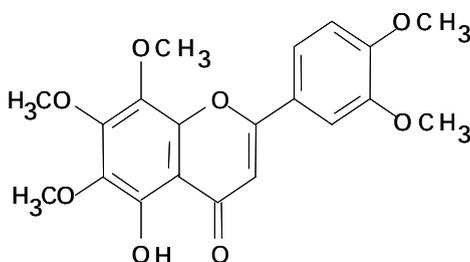


Fig II.11. Estructura de 5-*O*-desmetilnobiletina

### II.4.3. Actividad farmacológica

#### A. Introducción

Clásicamente a los flavonoides se les han reconocido las propiedades y actividades antiinflamatoria, antioxidante, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica [Manthey *et al*, 1999]. Entre ellas, las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes han sido empleadas desde hace tiempo tanto en medicina tradicional como en la industria.

Se han propuesto diferentes mecanismos que explican la actividad antiinflamatoria, demostrándose *in vitro* el efecto de los flavonoides sobre diferentes mediadores y enzimas proinflamatorias [Rotelli *et al*, 2003]. Como derivados fenólicos que son, actúan como agentes quelantes de metales y captadores de radicales libres, pueden regular la actividad de las células implicadas en la inflamación como mastocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Por ejemplo, algunos flavonoides inhiben la liberación de histamina de mastocitos y otros inhiben la proliferación de los linfocitos T. Todas estas propiedades son recogidas en revisiones recientes [Middelton *et al*, 2000; Havsteen , 2002].

Hay pruebas contundentes del efecto de los flavonoides en la producción de mediadores inflamatorios a través de la inhibición de enzimas implicados en el metabolismo del ácido araquidónico, así como en la producción de óxido nítrico. En los últimos tiempos se ha afianzado el hecho de que los flavonoides son capaces de modular la supresión

génica y es evidente que la actividad antiinflamatoria que poseen es, al menos en parte, debida a la supresión de genes proinflamatorios [Kim *et al.*, 2004]. Por ejemplo, nobiletina inhibe de forma dosis-dependiente la liberación de histamina inducida por el TPA en basófilos humanos, inhibe la infiltración leucocitaria, la expresión de COX-2, iNOS y producción de PGE<sub>2</sub> en ratones expuestos a aplicaciones tópicas de TPA [Mukarami *et al.*, 2000], inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> y la actividad pro-metaloproteinasa 9 (proMMP-9) en fibroblastos sinoviales de conejo [Ishiwa *et al.*, 2000], dicho efecto puede deberse a la inhibición de la actividad de unión de la proteína de activación-1 (AP-1), como han demostrado Sato *et al.* (2002) en un estudio realizado en células HT-1080 de fibrosarcoma. Además, nobiletina inhibe la producción de IL-1 $\beta$  inducida por PGE<sub>2</sub> en fibroblastos sinoviales humanos y disminuye la expresión de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y ARNm de IL-6 en macrófagos J774A.1 [Lin *et al.*, 2003], así como la expresión de COX-2 en RAW 264.7 [Mukarami *et al.*, 2005].

## **B. Efecto sobre la actividad de las cinasas**

Una de las cinasas que mayor implicación tiene en los procesos inflamatorios es la proteína cinasa C (PKC). Esta enzima es dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos, es multifuncional, fosforila residuos de serina y treonina y está implicada en un amplio rango de actividades celulares, incluyendo entre otros, la promoción de tumores, mitogénesis, procesos secretores y funciones de células inflamatorias [Nishizuka, 1995]. Una gran variedad de flavonoides podrían inhibir a la subunidad catalítica de

la PK dependiente de AMPc [Jinsart *et al.*, 1992]. El doble enlace C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> y la polihidroxilación de los anillos favorecen el desarrollo de actividad inhibitoria frente a la PKC. Es sabido que la inhibición de la PKC y la PK mitógeno activadora (MAPK) afecta a la transducción de señales de forma que se regula la capacidad de unión de los factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B o AP-1 al ADN [Kim *et al.* 2004; Ko *et al.* 2005].

### C. Efecto sobre la actividad de la fosolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

Tras la mordedura de una serpiente se produce una infiltración de neutrófilos próxima a la zona afectada como parte de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que el veneno de la cobra *Naja mossambica*, así como la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora (sPLA<sub>2</sub>) aislada del veneno, estimulan la traslocación del CD11b de los gránulos de los neutrófilos a la membrana plasmática y promueven la movilidad de éstos en superficies de colágeno. El veneno, así como la enzima aislada, actuarían causando una estimulación no enzimática de los neutrófilos, dando lugar a la activación de la PLA<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) y a la producción de metabolitos del ácido araquidónico involucrados en la estimulación y posterior desgranulación y motilidad de los neutrófilos. Así pues, el veneno que posee PLA<sub>2</sub>, se une a los fosfolípidos aniónicos expuestos en la superficie de los neutrófilos estimulados, contribuyendo a su vez a la producción de quimiocinas responsables de la infiltración de neutrófilos en la zona de la mordedura de la serpiente [Sundell *et al.*, 2003].

Sala *et al.* (2000) demostraron que sumidad florida de *Santolina chamaecyparissus* (Asteraceae) es una buena fuente de compuestos antiinflamatorios, conteniendo principios que inhiben la actividad PLA<sub>2</sub> tanto *in vivo* como *in vitro*, aislando el flavonoide nepetina como agente inhibidor de la actividad PLA<sub>2</sub>.

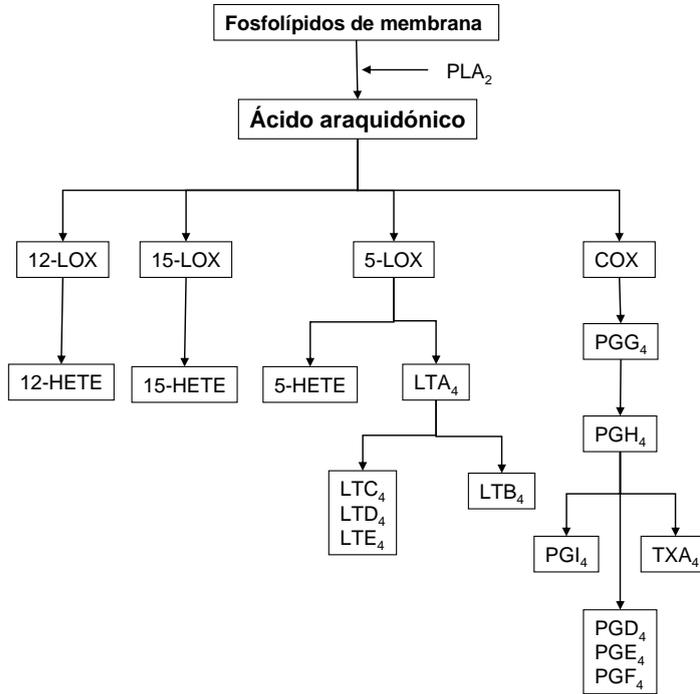
Entre los flavonoles citados por su actividad destacan kaempferol, quercetina y miricetina, los cuales poseen mayor efecto inhibidor la actividad PLA<sub>2</sub> del veneno de serpiente que las flavanonas hesperetina y naringenina, siendo por ello de relevancia la presencia del doble enlace entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> del anillo C [Kim *et al.*, 2004].

Chang *et al.*, (2005) demostraron que 2',4',7-trimetoxiflavona inhibía la liberación de PGE<sub>2</sub> sin afectar a la actividad COX-2, hecho que los autores del trabajo justificaron mediante la inhibición de la PLA<sub>2</sub>.

#### **D. Efecto sobre las enzimas COX y LOX**

El ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de membrana por la acción de la PLA<sub>2</sub> puede ser metabolizado por la vía de la COX para dar lugar a PGs y TXs. Existen dos isoformas diferentes de esta enzima, la COX-1 y la COX-2, aunque recientemente se ha descubierto una tercera, la COX-3. La COX-1 es una enzima constitutiva presente en todo tipo de células, proporcionando PGs citoprotectoras y TXs con propiedades agregantes plaquetarias. La COX-2 se expresa en mayores cantidades en células implicadas en la inflamación como macrófagos y

mastocitos, cuando éstos son estimulados con citocinas proinflamatorias y/o LPS [Kim *et al.* 2004].



**Fig II.12. Esquema del metabolismo del ácido araquidónico**

Muchos derivados de estructura flavona, como apigenina, son inhibidores de la COX, mientras que los flavonoles, como quercetina y miricetina, son preferentemente inhibidores de la LOX. Raramente se han descrito flavonoides inhibidores selectivos de COX-2, siendo más frecuentes los activos frente a COX-1. Wogonina es el único flavonoide descrito como inhibidor selectivo frente a COX-2. Algunos flavonoides son inhibidores duales COX-1/COX-2 y su actividad antiinflamatoria *in vivo* está relacionada con esa propiedad, reduciendo la producción PGs [Kim *et al.* 2004].

Las LOXs son las enzimas responsables de la producción de hidroxiácidos y LTs a partir de ácido araquidónico. Se han identificado 5-, 8-, 12- y 15-LOX en diferentes células y tejidos. Mientras la 15-LOX sintetiza el ácido 15 hidroxieicosatetranóico (15-HETE) con propiedades antiinflamatorias, las enzimas 5- y 12-LOX están implicadas en procesos de inflamación, alergia y asma a través de la producción de 5-HETE, LTA<sub>4</sub> y LTB<sub>4</sub>, metabolitos que actúan como potentes quimiotácticos. Se han realizado diversos estudios centrados en el efecto que los flavonoides ejercen sobre la actividad 5- y 12-LOX con el fin de dilucidar sus propiedades antiinflamatorias, entre los cuales destaca el de Kim *et al.* (2004), en el cual se ha visto que flavonoles como kaempferol, quercetina, morina y miricetina son más activos como inhibidores de la 5-LOX que de la 12-LOX, siendo además más activos que las flavonas. Hoult *et al.* (1994) estudiaron los efectos de los flavonoides sobre 5-LOX y COX en leucocitos peritoneales de rata y leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos estimulados con Ca<sup>2+</sup> e ionóforo de calcio A23187. Según este estudio, los compuestos polihidroxilados inhiben la 5-LOX de un modo más efectivo que los no hidroxilados. Previamente, Laughton *et al.* (1991) habían demostrado que una combinación de propiedades hierro-quelantes/hierro-reductoras son necesarias para la inhibición selectiva de la 5-LOX en leucocitos peritoneales por compuestos fenólicos, lo que justifica un posible mecanismo de acción de estos compuestos como inhibidores de la actividad 5-LOX. Sin embargo, estudios más recientes han especulado que este no es el único mecanismo de acción que justifica los efectos celulares de los flavonoides [Rice-Evans, 2001]. De hecho, existen ejemplos de inhibidores de 5-LOX que se

alejan de las características estructurales típicas de fenoles antioxidantes como ciertas flavonas metiladas [Alcaraz *et al.*, 1987; Laughton *et al.*, 1991] y flavanonas como pinocembrina [Sala *et al.*, 2003].

### **E. Efecto sobre las enzimas inducibles COX-2 e iNOS**

Es evidente que el control de la expresión de ciertas enzimas inducibles es llevado a cabo por factores de transcripción, entre ellos el NF- $\kappa$ B, que se encuentran en el citoplasma celular y migran al núcleo tras el estímulo de ciertas señales [Wong *et al.*, 1999].

Los flavonoides pueden afectar la expresión de ciertas enzimas a este nivel. En la mayoría de los casos, los estudios se han realizado con macrófagos estimulados con LPS. Algunos flavonoides inhiben la expresión génica de COX-2 y de iNOS, aunque con diferente potencia y selectividad [Chen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002].

El NO es una molécula que fácilmente difunde entre las células y está implicado en un amplio número de efectos biológicos tanto fisiológicos como patológicos. Se genera por acción de la NOS que cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina. Se han caracterizado tres isoformas diferentes, cada una codificada por diferentes cromosomas. Dos isoformas se expresan de modo constitutivo (NOS endotelial y NOS neuronal), mientras que la tercera es inducible (iNOS). Se han realizado estudios con flavonoides de diferente estructura en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS o citocinas con el fin de establecer la posible relación entre su estructura química y la actividad

inhibidora de la producción de NO. Algunos flavonoles e isoflavonas, pero principalmente las flavonas, inhibieron la producción de NO, siendo el doble enlace entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> imprescindible para su actividad, mientras que las sustituciones hidroxilo en los anillos A y B influyen en el efecto antiinflamatorio. Se ha observado que los flavonoides más efectivos no inhibieron significativamente la actividad de la iNOS y sin embargo, suprimieron su expresión. Apigenina, luteonina, quercetina, genisteina y kaempferol inhibieron la producción de NO regulando negativamente la actividad enzimática [Kim *et al.* 2004].

En el estudio llevado a cabo por Olszanecki *et al.* (2002) se demostró que la supresión de la inducción de la iNOS, puede incrementar la actividad de la NOS constitutiva en el endotelio vascular, evitando así los procesos de aterotrombosis. Los flavonoides más potentes en este estudio fueron kaempferol y apigenina.

#### **F. Efecto sobre los factores de transcripción**

El factor nuclear de transcripción NF- $\kappa$ B es el mayor efector de la vía implicada en la inflamación y en la respuesta inmune innata. Este factor posee una subunidad inhibitoria (I $\kappa$ B) que lo retiene en el citoplasma hasta que la llegada de un estímulo a la célula la fosforila por medio de una cinasa (I $\kappa$ B cinasa, IKK), la cual se degrada y libera a la parte activa del factor transcripcional permitiendo la translocación del factor al núcleo, la unión a los elementos del promotor  $\kappa$ B y finalmente la transcripción de genes. La activación de NF- $\kappa$ B induce la transcripción genética de numerosos mediadores pro-inflamatorios, incluyendo las

enzimas iNOS y COX-2, así como los mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, entre otros, siendo la destrucción de I $\kappa$ B un proceso crítico para la activación del NF- $\kappa$ B.

Generalmente, los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante, y mediante la reducción de especies reactivas oxigenadas (ROS), pueden inhibir de forma inespecífica al NF- $\kappa$ B. Sin embargo, la evidencia de la intervención de las ROS en la activación del factor de transcripción está limitada a algunas líneas celulares y sólo está bien caracterizada en linfocitos [Bremner *et al.*, 2002].

Los factores de transcripción son modulados por distintos flavonoides, como por ejemplo la polimetoxiflavona nobiletina, la cual acelera la síntesis *de novo* de I $\kappa$ B en vez de degradarlo. Además, es un inhibidor moderado tanto de iNOS (52%) como de COX-2 (42%) [Mukarami *et al.*, 2003]. El derivado eupalitina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosido a 100  $\mu$ M inhibe la translocación del NF- $\kappa$ B en leucocitos polimorfonucleares estimulados con fitohemaglutinina (PHA) [Pandey *et al.* 2005]. En la revisión de Bremner *et al.* (2002) se recogen numerosos compuestos fenólicos que actúan a nivel del factor de transcripción, entre los cuales cabe destacar la teaflavina-3,3'-digalato que afecta a la activación del NF- $\kappa$ B mediante la inhibición de la expresión del IKK $\alpha$  en macrófagos RAW 264.7. Wogonina, baicalina, baicaleína, y oroxilina A inhibieron la producción de NO mediante la anulación de la expresión de la iNOS.

Xagorari *et al.* (2001) estudiaron el efecto de diversos flavonoides sobre la producción de TNF- $\alpha$ , siendo luteolina y quercetina los inhibidores más potentes. Luteolina inhibe la fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B- $\alpha$  estimulada por LPS, con lo que controla la expresión de ciertas citocinas, como el TNF- $\alpha$ .

#### **G. Efecto sobre la actividad de proteasas: elastasa y los procesos de desgranulación en neutrófilos**

La activación de los neutrófilos les conduce a la liberación de múltiples productos microbicidas, como radicales de oxígeno, péptidos catiónicos, eicosanoides y enzimas proteolíticas, que sirven normalmente para combatir a los microbios patógenos invasores. Sin embargo, cuando esta liberación se realiza de una forma incontrolada, los productos citotóxicos afectan a las células de alrededor. La elastasa es una serina-proteasa que se encuentra en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Los sustratos de esta enzima incluyen proteínas de la matriz extracelular como colágeno, elastina, fibrina, fibronectina, el receptor de plaquetas IIb/IIIa, etc. Además, la elastasa puede degradar numerosas proteínas solubles como factores de coagulación, inmunoglobulinas, complemento y numerosos inhibidores de proteasas [Lee *et al.* 2001].

La estimulación de los neutrófilos para que liberen elastasa puede realizarse mediante su exposición a determinadas citocinas y quimiotácticos, como el TNF- $\alpha$ , IL-8, C5a, LPS y el tripéptido derivado de la pared bacteriana, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).

Se han realizado diversos estudios con flavonoides con el fin de buscar inhibidores selectivos de la enzima elastasa. Entre ellos destaca el de Sartor *et al.* (2002a), que establecieron los requerimientos estructurales para observar una actividad inhibitoria óptima. Entre ellos, la necesidad de un doble enlace entre C2–C3, un grupo hidroxilo en C3 (flavonol) y tres grupos hidroxilo en el anillo B (trihidroxi flavonoles). Además, demostraron que el 3-galato de epigalocatequina inhibe la elastasa con una CI<sub>50</sub> de 0,4  $\mu$ M, valor 50, 150 y 2500 veces inferior que los obtenidos frente a gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), trombina y catepsina G, respectivamente [Sartor *et al.*, 2002b]. En otro estudio, Tou (2002) observó que genisteína inhibe la actividad de la fosfolipasa D (PLD), relacionada con la desgranulación de neutrófilos, siendo necesaria una mayor concentración del flavonoide para reducir la desgranulación que para inhibir la actividad PLD.

Selloum *et al.* (2002) ensayaron el efecto de rutinósido en el edema inducido por carragenina en pata de rata, en la quimiotaxis de los neutrófilos y en su desgranulación además de la exocitosis de elastasa. El flavonoide redujo el edema plantar a las 2 horas de la inyección del mucopolisacárido e inhibió de forma dosis dependiente la quimiotaxis. En cuanto a la liberación de elastasa, ésta fue sólo parcialmente inhibida por rutinósido a concentraciones superiores a 25  $\mu$ M.

Wei *et al.* (2001) observaron que kaempferol y quercetina inhiben la liberación de enzimas como  $\beta$ -glucuronidasa y lisozima en neutrófilos de rata estimulados con citocalasina. La inhibición de los procesos secretores

está regulada por la activación de una isoenzima de la PKC independiente de Ca<sup>2+</sup>.

#### **H. Efecto sobre la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión celular**

Las citocinas son hormonas locales genuinas (sistema auto/paracrino), aunque algunas tienen una función endocrina. No están preformadas sino que se sintetizan en respuesta a un estímulo activador, a continuación son liberadas y actúan sobre receptores específicos de membrana celular, cuya expresión es también a veces un fenómeno transitorio, como es el caso de la inflamación. De entre ellas podemos destacar el TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y diversas interleucinas. Las moléculas de adhesión celular se encargan de fijar en la pared del endotelio vascular a los leucocitos que migrarán hacia el foco inflamatorio en el tejido [Aplin *et al.*, 1998].

Manthey *et al.* (1999) y Delaney *et al.* (2001), demostraron que diversas flavonas polimetoxiladas inhiben la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por LPS en monocitos humanos. La producción de TNF- $\alpha$  fue suprimida a nivel de expresión génica por una heptametoxiflavona, que actuó como un potente inhibidor de la actividad fosfodiesterasa, elevando los niveles de AMPc en monocitos.

Respecto al papel de los flavonoides sobre las moléculas de adhesión, el estudio realizado por Bito *et al.* (2002) demostró como, entre otros flavonoides ensayados, taxifolina fue el inhibidor más potente de

la expresión de la proteína de adhesión ICAM-1 inducida por IFN- $\gamma$  en queratinocitos humanos. El efecto se produce a nivel transcripcional, al inhibir la activación del factor de transcripción STAT1 (*Signal transducers and activators of transcription*), fosforilado en un residuo de tirosina por la JAK1 (*Janus kinase*).

### **I. Efecto sobre la proliferación celular. Profilaxis contra el cáncer e inducción de apoptosis**

Los flavonoides poseen propiedades importantes en la prevención del cáncer. En los últimos años la atención de los investigadores se ha volcado en la capacidad inhibidora de estos compuestos sobre el ciclo y proliferación celular, estrés oxidativo e inducción de la detoxificación enzimática, apoptosis y modificación de la respuesta inmune [Birt *et al.*, 2001]. Algunas propiedades protectoras contra el cáncer han sido asociadas a alimentos ricos en flavonoides, por ejemplo flavonoles de cebolla, isoflavonas de soja, proantocianidinas del té verde, etc. [Le Marchand, 2002; Lambert *et al.*, 2005].

Se han llevado a cabo estudios sobre la prevención del cáncer en animales de experimentación que han demostrado la importancia de los flavonoides al inhibir el desarrollo de células cancerosas *in vivo*. Así, naringina y genisteína administrados en la dieta retrasaron la aparición y el número de tumores de mama en rata inducidos con 7,12-dimetillbenz( $\alpha$ )antraceno. Además, diferentes estudios realizados *in vitro* con flavonoides, como genisteína y quecertina, indican que su actividad preventiva frente al cáncer puede ser debida a la modificación de la vía

de transducción de señales, produciendo inhibición del crecimiento y transformación celular, promoción de la apoptosis, reducción de la invasividad y disminución de la angiogénesis [Lambert *et al.*, 2005]. Por otro lado, genisteína inhibió el crecimiento celular de líneas tumorales de cáncer de mama tanto con receptor estrógeno positivo (MCF-7) como negativo (MDA-MB-468) [Birt *et al.*, 2001].

Aunque la mayoría de los flavonoides no resulten tóxicos para humanos y animales, sí han mostrado capacidad para inhibir la proliferación en distintas líneas tumorales humanas [Birt *et al.*, 2001]. Se piensa que las propiedades preventivas demostradas *in vivo* pueden ser debidas a la capacidad de estos compuestos para inhibir la fase I e inducir la fase II del metabolismo enzimático de la célula tumoral que inicia el proceso. La reducción del proceso carcinogénico puede ser debida a su efecto sobre enzimas que liberan radicales de oxígeno, reduciendo la actividad de enzimas que contribuyen a la síntesis de ADN e inhibiendo las proteína-cinasas que intervienen en la transducción de señales. Finalmente, previenen el desarrollo de tumores induciendo la apoptosis de las células tumorales al inhibir la topoisomerasa II y regulando negativamente la expresión de la proteína p53 o provocando toxicidad mitocondrial, lo cual da lugar al proceso apoptótico [Galati *et al.*, 2004].

Los flavonoides quercetina, taxifolina, nobiletina y tangerina mostraron efectos antiproliferativos en carcinoma epidermoide HTB43 [Kandaswami *et al.*, 1991]. En otro estudio llevado a cabo con 27

citroflavonoides en varias líneas tumorales, como carcinoma de pulmón A 549 y de estómago TGBC11TKB, se observó que éstos eran capaces de inhibir la proliferación celular de las líneas cancerígenas sin afectar a las células normales humanas [Kawaii *et al.*, 1999]. El ensayo realizado en 6 líneas celulares cancerígenas mostraron que los flavonoides inhiben la proliferación y la angiogénesis con unas concentraciones de rango micromolar muy bajo, es decir en condiciones de biodisponibilidad fisiológicas [Fotsis *et al.*, 1997; Manthey *et al.*, 2002].

La propiedad antiproliferativa demostrada por diversos flavonoides sugiere que estos compuestos pueden inhibir el ciclo celular o bien inducir apoptosis. De hecho, se ha visto que los flavonoides son capaces de regular las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular de líneas cancerígenas [Birt *et al.*, 2001]. Genisteína, genistina, daidzeína y biochanina A inhibieron el crecimiento de células de líneas tumorales de vejiga de ratón y humana al frenar la progresión del ciclo celular e inducir apoptosis [Zhou *et al.*, 1998]. Quercetina bloqueó el ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>-S en células de cáncer de colon COLO 320 DM [Hosokawa *et al.*, 1992] y células T leucémicas [Yoshida *et al.*, 1992], induciendo apoptosis [Wei *et al.*, 2001]. Estudios realizados con nobiletina frente a células humanas de cáncer de colon han puesto de manifiesto su capacidad antiproliferativa, al inhibir la progresión del ciclo celular e inducir apoptosis en las líneas COLO 320, SW 480 y CACO 2 [Zheng *et al.*, 2002]. Además, nobiletina inhibió la proliferación de células de hepatocarcinoma humano y de rata, frenando la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M e induciendo apoptosis. Mediante RT-PCR

(*reverse-transcription polymerase chain reaction*) semicuantitativa a tiempo real se observó que nobiletina disminuye la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, *bcl-2*, y las ciclinas E y B en la línea MH1C1 correspondiente a células de hepatocarcinoma de rata [Ohnishi *et al.*, 2004]. En cuanto a la modulación de la apoptosis, Lee *et al.* (2002) observaron que nobiletina induce la digestión del ADN genómico de forma dosis dependiente, efecto inferior a otros conocidos flavonoides como wogonina y fisetina.

Resulta importante conocer la capacidad antioxidante o prooxidante de los flavonoides, ya que está relacionada con su posible efecto pro-apoptótico. Ko *et al.* (2005) proponen dos mecanismos para la inducción de apoptosis por flavonoides, uno de ellos sería independiente de especies reactivas oxigenadas (ROS), el cual tiene lugar cuando los flavonoides contienen más de un OH libre en la molécula, mientras que el otro mecanismo sería dependiente de ROS, y tendría lugar cuando los flavonoides poseen uno o ningún OH libre. Es sabido que las ROS ponen en funcionamiento la maquinaria molecular para inducir la apoptosis en células tumorales, y numerosos genes relacionados con la apoptosis han sido identificados así como también las caspasas, las proteínas de la familia *bcl-2* y la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En su estudio, Ko *et al.* (2005) demostraron que la hidroxilación de los flavonoides en las posiciones 4' y 6 es crucial para su actividad pro-apoptótica, y que la activación de las ROS y la cascada de la caspasa-3 están implicadas en el proceso apoptótico.

Las caspasas provienen de una familia de cisteína-proteasas autocatalíticas, las cuales regulan numerosos procesos celulares, incluyendo apoptosis, diferenciación celular e inflamación. Existen tres grupos de caspasas y se clasifican dependiendo su función y la especificidad del sustrato. El grupo 1 de caspasas, que incluye las caspasas-1, -4, -5 y -14, está implicado en la síntesis de citocinas y en la inflamación. La caspasa-1, originalmente conocida como enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE), fue la primera caspasa descubierta y es esencial en la producción de citocinas IL-1 y IL-18. Las caspasas pertenecientes a los otros dos grandes grupos tienen funciones relacionadas, especialmente con la apoptosis, e intervienen en otras cascadas proteolíticas que llevan a la fragmentación del ADN y a la degradación de múltiples sustratos [Krakauer, 2004].

Estudios llevados a cabo en linfocitos indican que se requiere la activación de determinadas caspasas para la proliferación de células T estimuladas mediante un agente mitógeno o bien mediante el anti-CD3. La inhibición de determinadas caspasas da lugar a un bloqueo de la linfoproliferación, viendo que la ruptura selectiva del sustrato es llevada a cabo por linfocitos viables y en proliferación [Alam *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1999], donde la función de las caspasas es independiente de la de su papel en la apoptosis. En linfocitos T humanos, son cruciales en la activación del NF- $\kappa$ B, con lo cual lo son también en la inducción del sistema IL-2/IL-2R y por tanto en la progresión del ciclo celular, inducida por agentes mitógenos [Wilhelm *et al.* 1998, Kennedy *et al.* 1999, Alam *et al.* 1999, Mack *et al.* 2002].

Apigenina, una flavona abundante en frutos y vegetales se caracteriza por ser antiproliferativa, antiinflamatoria y antimetastásica. Sin embargo, los mecanismos por los que ejerce esas actividades no están bien definidos. Recientemente se ha publicado [Vargo *et al.*, 2006] que el efecto antiproliferativo y proapoptótico en células leucémicas y en monocitos es a través de la activación de la caspasa 3 y de la PKC $\delta$ , un miembro de la familia de PKC que se activa en diferentes tipos de células en respuesta a varios estímulos apoptóticos. En este sentido, Sergeev *et al.* (2006) estudiando el efecto apoptótico de diferentes flavonas polimetoxiladas en células de cáncer de mama, han sugerido que estas flavonas favorecen la apoptosis a través de la activación de caspasas cuya activación depende, a su vez, de la concentración intracelular de calcio, por ejemplo la caspasa-12.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Compuestos objeto de estudio

##### III.1.1. Flavonoide

El flavonoide 5-O-Desmetilnobiletina (5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona, Fig. III.1) fue obtenido a partir de *Sideritis tragoriganum* Lag. subs. *mugronensis* (Borja) C. Obón de Castro y D. Ribera Núñez.

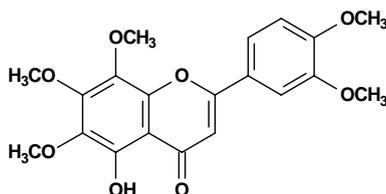


Fig III.1. Estructura de 5-O-Desmetilnobiletina

##### III.1.2. Iridoides

Los iridoides escrovalentinósido (6-O-(2'',3''-di-O-acetyl- 4''-O-p-metoxi- cinamoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil catalpol, Fig. III.2) y escropoliósido A (6-O-(2'',4''-di-O-acetyl-3''-O-p-metoxi-cinamoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil catalpol, Fig. III.2) se aislaron a partir de *Scrophularia auriculata* subs. *pseudoauriculata* (Senn.) Bolòs et Vigo (*S. valentina* Rouy) [Giner *et al.*, 1998].

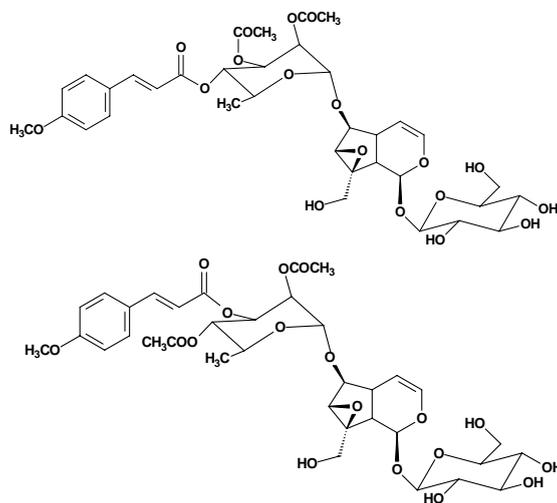


Fig III.2. Estructuras de escrovalentinósido y escropoliósido A

## III.2. Actividad antiinflamatoria *in vivo* y *ex vivo*

### III.2.1. Animales de experimentación

Los animales empleados son ratones hembras albinas de la raza Swiss procedentes de la compañía Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona), de 3 meses de edad y peso entre 25-30 g. Una vez recibidos, se estabulan bajo condiciones perfectamente estandarizadas: temperatura  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial estándar y agua *ad libitum*. Los animales se distribuyen a razón de 5 ó 6 por grupo de estudio.

Las ratas utilizadas para la obtención de células peritoneales son hembras de la raza Wistar de 180-200 g de la compañía Harlan

Interfauna Ibérica, S.L. (Barcelona). Una vez recibidos, se estabulan bajo condiciones perfectamente estandarizadas: temperatura  $22 \pm 3$  °C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial estándar y agua *ad libitum*.

Tanto las condiciones de cuidado de los animales como las de ensayo siguen las indicaciones del Comité Ético de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València de acuerdo con las directrices de la Unión Europea, actualmente desarrollado en el Real Decreto 1201/2005.

### III.2.2. Aparatos y material de laboratorio

**Tabla III.1. Material empleado en las pruebas *in vivo***

Balanza de precisión (0,0001 g)	Sartorius
Baño termostatado con agitación	SW 20, Julabo
Homogeneizador	Politrón, Kinematica
Máquina cortapelo	Type 1400, Moser
Material desechable	Discardit II
Material quirúrgico	Pinzas y tijeras
Microjeringas	100 µL, Hamilton
Micrómetro digital	Series 293, Mitutoyo
Microscopios	Nikon Phase Contrast-2, ELWD 0.3 Nikon Eclipse TE2000-S
Pipetas automáticas	Eppendorf Research Labnet, BioPette
Pletismómetro	7150, Ugo Basile

**III.2.3. Reactivos****Tabla III.2.** Reactivos empleado en las pruebas *in vivo*

Acetona PA	Merck
Agua oxigenada 33%	Sigma
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB)	Sigma
$\lambda$ - Carragenina	Sigma
Ciproheptadina	Sigma
Dexametasona (DXM)	Sigma
Dinitrofluorobenceno (DNFB)	Sigma
Eritrocitos de cordero (SRBC)	Sigma
Etanol 96% PA	Panreac
Formaldehído 40% PA	Panreac
Ibuprofeno	Sigma
Oxazolona (4-etoximetilen-2-feniloxazol-5-ona)	Sigma
PLA <sub>2</sub> <i>Naja mossambica</i>	Sigma
Sales inorgánicas para análisis	Sigma
Tetrametilbenzidina (TMB)	Sigma
13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)	Sigma
Tween 80	Fluka

### III.2.4. Tampones

Tabla III.3. Composición de tampones y soluciones

<b>Tampón fosfato sódico 0,22 M</b>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	39,204 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	29,964 g
	$\text{H}_2\text{O}$	c.s.p. 1L
	pH= 5,4	
<b>Tampón NaOAc 1,46 M</b>	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$	1,46 M
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	
	pH=3	
<b>Tampón salino basificado</b>	$\text{NaCl}$	0,9%
	$\text{NaHCO}_3$	0,1%
	$\text{H}_2\text{O}$	c.s.p. 1L
	pH= 7,4	

### III.3. Métodos *in vivo* y *ex vivo*

#### III.3.1. Hipersensibilidad por contacto inducida por dinitrofluorobenceno (DNFB)

La aplicación tópica de 2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB) tras la sensibilización previa con la misma sustancia, produce una reacción de hipersensibilidad por contacto, que se caracteriza por la aparición de una reacción ecematosas, con presencia de linfocitos, macrófagos y edema en la epidermis.

El método seguido fue el desarrollado por Góngora *et al.* (2000). Los

ratones se reparten en seis grupos: control (el tratamiento es el vehículo), el fármaco de referencia dexametasona (0,025 mg/oreja) y sustancias objeto de estudio 5-O-desmetilnobiletina, escropoliósido A y escrovalentinósido (0,5 mg/oreja). También se incluye un grupo sin sensibilizar para asegurar que el edema no es resultado de irritación, sino consecuencia de la respuesta inflamatoria de hipersensibilidad.

Los ratones se sensibilizan durante dos días consecutivos mediante la aplicación tópica de 20  $\mu$ L de DNFB al 0,2% en acetona sobre el abdomen rasurado. Se miden las orejas de todos los ratones (sin inflamar) con un micrómetro digital (Mitutoyo). A los cinco días (a partir del día 1 tras la aplicación) se provoca la reacción aplicando 20  $\mu$ L de DNFB al 0,2% en acetona en cada oreja (10  $\mu$ L en cada superficie). A las 2, 24 y 48 horas se administra a cada grupo el producto objeto de estudio.

A las 24, 48 y 72 horas se efectúan las medidas del espesor de las orejas, sacrificando algunos ratones para tomar las muestras para los estudios histológicos, inmunohistoquímicos y bioquímicos.

El edema se calcula como la diferencia entre el espesor que se produce en las orejas antes de desencadenar la reacción y el espesor de éstas a las 24, 48 y 72 horas.

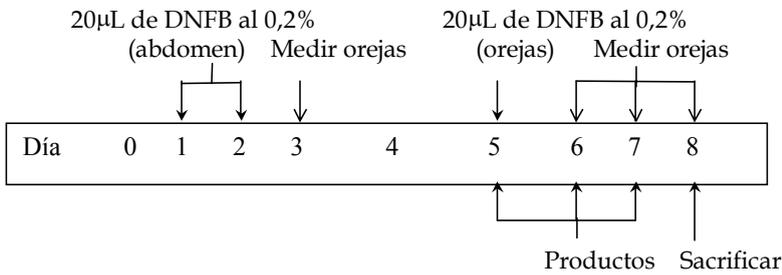


Fig. III.3. Esquema de la inducción y tratamiento de la hipersensibilidad por contacto por **DNFB**

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta E_c - \Delta E_p}{\Delta E_c} \times 100$$

$\Delta E_c$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo control,

$\Delta E_p$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo problema.

### III.3.2. Hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona

La aplicación tópica de oxazolona tras la sensibilización previa con la misma sustancia, produce de igual forma que el DNFb, una reacción de hipersensibilidad por contacto, que se caracteriza por la aparición de una reacción eczematosa, con infiltración de linfocitos y macrófagos acompañada de edema en la epidermis.

Protocolo basado en Wang *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Los ratones se reparten en seis grupos en función del tratamiento aplicado: control (vehículo), dexametasona (0,025 mg/oreja), 5-O-desmetilnobiletina, escropoliósido A y escrovalentinósido (0,5 mg/oreja) y un grupo sin sensibilizar.

Los ratones se sensibilizan el día 1 mediante la aplicación en el abdomen rasurado de 150 µL de oxazolona al 3% en acetona (p/v). La reacción se provoca mediante la aplicación de 10 µL de oxazolona al 1% el día 6. Se aplica el producto, el fármaco de referencia o el excipiente, a los grupos respectivos, a las 6, 24 y 48 h, contadas a partir del desencadenamiento (día 6). Las medidas de las orejas se realizaron a las 24, 48 y 72 h a partir del día 6 del mismo modo que en el método anterior.

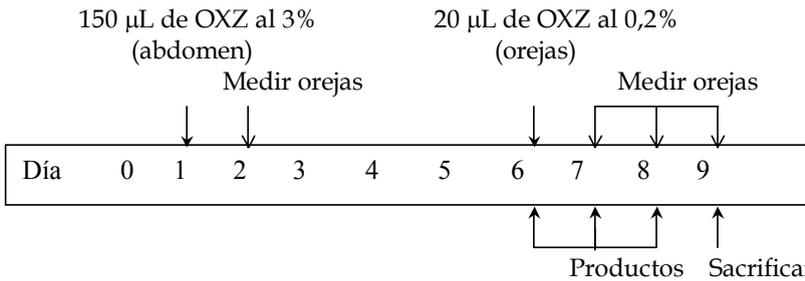


Fig. III.4. Esquema de la inducción y tratamiento de la hipersensibilidad por contacto por OXZ

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta E_c - \Delta E_p}{\Delta E_c} \times 100$$

$\Delta E_c$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo control,

$\Delta E_p$  = media aritmética del incremento de espesor auricular del grupo problema.

### III.3.3. Hipersensibilidad retardada inducida por eritrocitos de cordero (SRBC)

La inyección subcutánea de eritrocitos de cordero (SRBC) tras una previa sensibilización, produce una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo tuberculínico, que tiene lugar sobretudo en la dermis. Se manifiesta con induración y presencia de linfocitos, monocitos y macrófagos en la zona afectada.

Se sigue el método desarrollado por Góngora *et al.* (2000). Los ratones se reparten en seis grupos: control (vehículo), dexametasona (10 mg/Kg), 5-*O*-desmetilnobiletina, escropoliósido A y escrovalentinósido (15 mg/Kg) y un grupo sin sensibilizar.

La sensibilización se inicia mediante la inyección subcutánea en la espalda de los ratones de 0,1 mL de  $2 \times 10^7$  de eritrocitos. La reacción de hipersensibilidad se provoca el día 5 mediante la inyección de 25  $\mu$ L de  $1 \times 10^8$  de eritocitos subcutáneamente en la aponeurosis plantar trasera derecha, mientras que en la aponeurosis plantar trasera izquierda se inyecta suero salino. Los productos se administran intraperitonealmente 2 h antes de provocar la reacción y 16 h después. Se utiliza etanol:Tween 80: H<sub>2</sub>O (1:1:10) como excipiente. El volumen de las patas se mide con un pletismómetro (Ugo Basile) a las 18, 24 y 48 h. El edema se calcula como la diferencia de volumen entre la pata derecha (inflamada) y la izquierda (no inflamada).

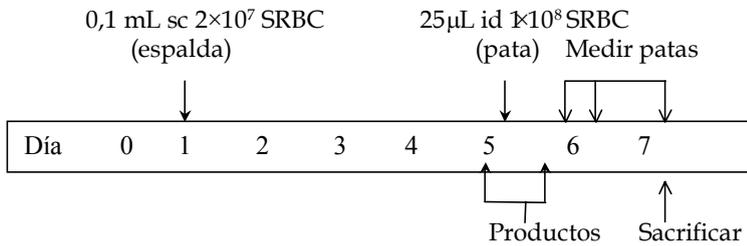


Fig. III.5. Esquema de la inducción y tratamiento de la hipersensibilidad retardada por SRBC

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta V_c - \Delta V_p}{\Delta V_c} \times 100$$

$\Delta V_c$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo control,

$\Delta V_p$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo problema.

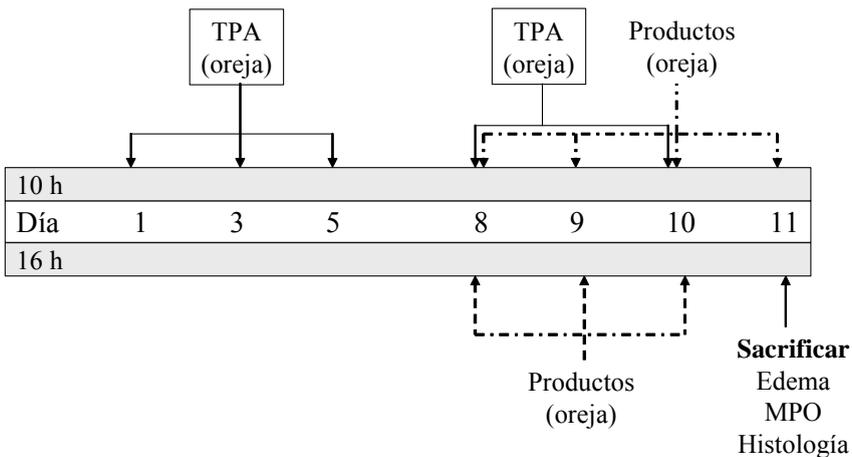
### III.3.4. Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)

El método desarrollado por Stanley *et al.* (1991) se basa en el empleo repetido de 13-acetato de 12-O-tetradecanoliforbol (TPA) como agente irritante, dando lugar a una respuesta inflamatoria e hipertrofia cutánea, características que pueden recordar algunos de los signos de enfermedades de la piel tales como la psoriasis.

Los ratones se distribuyen en cuatro grupos en función del tratamiento aplicado: control (vehículo), dexametasona (0,025 mg/oreja) y 5-O-desmetilnobiletina (0,5 mg/oreja).

Se aplican 5 dosis de TPA (2  $\mu\text{g}$ /oreja en 20  $\mu\text{L}$  de acetona) en ambas superficies de las orejas en días alternos. La lesión auricular aparece durante la primera semana de la experiencia, mientras que en la segunda semana se observa el efecto del tratamiento con los fármacos, si bien se continúa administrando el TPA con el fin de perpetuar la lesión. El régimen de administración de 5-*O*-desmetilnobiletina y de dexametasona es doble durante toda la semana, excepto el último día que se administra una sola dosis.

Las muestras se aplican tópicamente por la mañana a la misma hora que el TPA y la segunda dosis se administra 6 h más tarde. El último día los animales se sacrifican por dislocación cervical. Se obtienen secciones circulares de las orejas de cada animal con ayuda de un sacabocados, se pesan las orejas y se determina la inflamación por diferencia de peso con respecto al grupo control.



**Fig. III.6. Esquema de la inducción y tratamiento de la inflamación crónica por aplicación repetida de TPA**

A continuación, ocho muestras de porciones de 7 mm de oreja de cada grupo se introducen en solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) y se congelan para posteriormente determinar la actividad mieloperoxidasa (MPO). Dos muestras de cada grupo se introducen en formol 4% y se destina al estudio histológico.

La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la siguiente expresión matemática:

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

$\Delta P_c$  = (media aritmética de pesos de las orejas tratadas con TPA) -  
(media aritmética de pesos de las orejas tratadas con acetona),

$\Delta P_p$  = (media aritmética de pesos de las orejas tratadas con el problema)  
- (media aritmética de pesos de las orejas tratadas con acetona).

#### III.3.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima localizada en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), cuya valoración permite obtener una estimación indirecta de la infiltración celular producida en una respuesta inflamatoria, pudiéndose emplear como marcador del contenido de neutrófilos, debido a su abundancia en estas células. El experimento se basa en el método de Suzuki *et al.* (1983) modificado por De Young *et al.* (1989) para su empleo con un lector de placas.

Las muestras de las orejas, se mantienen congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un tubo eppendorf con 0,75 mL de HTAB al 0,5% en tampón fosfato sódico 80 mM. Se descongelan y se homogeneizan a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 seg. El homogenado se vierte de nuevo en el tubo eppendorf y se completa con un volumen igual de HTAB. El total (1,5 mL) se centrifuga a 10300 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Finalmente, se toman 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se añaden a una microplaca conjuntamente con 100  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato salino (PBS), 85  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato sódico ( $\text{pH} = 5,4$ ) y 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,017%. La reacción comienza al adicionar 20  $\mu\text{L}$  de clorhidrato de tetrametilbencidina (TMB) 18,4 mM en una solución acuosa de dimetilformamida. Se incuba a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 min. La reacción se detiene adicionando 30  $\mu\text{L}$  de tampón acetato sódico 1,46 M a  $\text{pH}=3$  en un baño de hielo. La actividad enzimática se determina colorimétricamente empleando un lector de placas, midiendo la absorbancia a 630 nm.

Tabla III.4. Protocolo para determinar la actividad MPO

Acción	Protocolo
Inducción	30 $\mu$ L del sobrenadante 100 $\mu$ L de PBS 85 $\mu$ L de tampón fosfato 0,22 M (pH=5,4) 15 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 0,017%
Inicio de la reacción	20 $\mu$ L de TMB 18,4 mM
Incubación	Estufa termostataada a 37 °C
Detención de la reacción	Baño de hielo 30 $\mu$ L de tampón NaOAc 1,46 M (pH=3)
	Medir la absorbancia a 630 nm

El porcentaje de inhibición de la actividad MPO se calcula según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\hat{A}_c - \hat{A}_p}{\hat{A}_c} \times 100$$

$\hat{A}_c$  = media aritmética de la absorbancia del grupo control,

$\hat{A}_p$  = media aritmética de la absorbancia del grupo problema.

### III.3.6. Edema inducido por carragenina en pata de ratón

La carragenina es un mucopolisacárido que se obtiene a partir del alga roja *Chondrus crispus*. La inflamación inducida al inyectar este mucopolisacárido es aguda, no inmune, es decir de tipo humoral. Se trata de una reacción bien estudiada y altamente reproducible. Inmediatamente después de la inyección subcutánea de carragenina se desarrollan los típicos signos de la inflamación, edema, hiperalgesia y eritema, como resultado de la acción de los agentes proinflamatorios, bradicinina, histamina, taquicininas, el complemento y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estos agentes pueden ser generados *in situ* en el sitio de la inyección o bien por células infiltradas. Los neutrófilos son un ejemplo, migran al lugar de la inflamación y generan especies reactivas de oxígeno así como otros agentes proinflamatorios. La respuesta inflamatoria normalmente es cuantificada por el incremento en el tamaño de la pata (edema), que es máximo alrededor de 5 horas después de la inyección y es modulado por inhibidores de los mediadores que intervienen en la cascada inflamatoria, como por ejemplo los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [Morris, 2003].

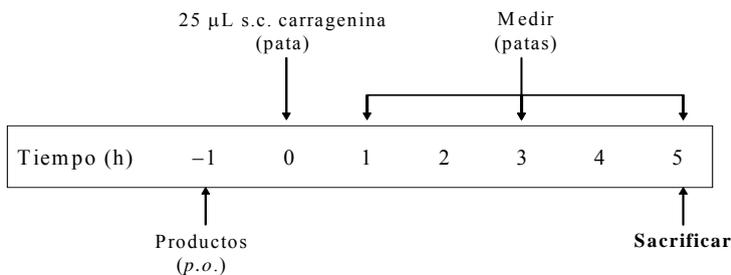


Fig. III.7. Esquema de la inducción y tratamiento del edema por carragenina

El método seguido fue el desarrollado por Sugishita *et al* (1981). El edema es inducido mediante inyección subcutánea de 25  $\mu$ L de carragenina (3% p/v en salino) en la aponeurosis plantar trasera derecha. 5-O-Desmetilnobiletina es administrado oralmente 1 hora antes de la inyección de carragenina a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y el ibuprofeno a 60 mg/kg en un tampón salino ligeramente basificado para favorecer su absorción (NaCl 0,9%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1%, pH 7,4). El grupo control sólo recibe oralmente tampón salino. El edema se mide como aumento del volumen de la pata mediante un pletismómetro 1, 3 y 5 horas después de provocar la inflamación y se expresa como la diferencia entre el volumen de la pata derecha y el de la izquierda. La inhibición del edema se expresa como porcentaje de reducción del volumen de la pata respecto del control.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta V_c - \Delta V_p}{\Delta V_c} \times 100$$

$\Delta V_c$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo control,

$\Delta V_p$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo problema.

#### **III.3.7. Edema inducido por fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en pata de ratón**

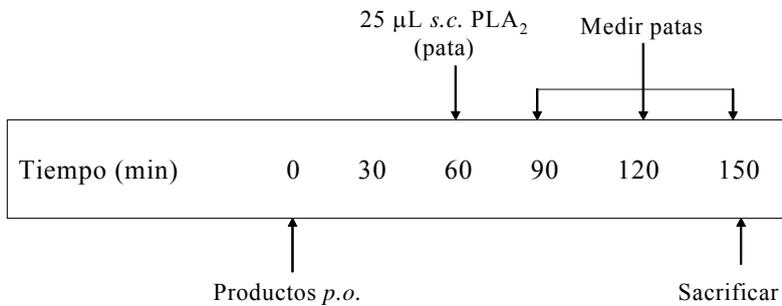
Tras la mordedura de una serpiente se produce una infiltración de neutrófilos próxima a la zona afectada como parte de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que el veneno de la cobra *Naja mossambica*, así como la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretoria (PLA<sub>2s</sub>) aislada del

veneno, estimulan la traslocación del CD11b de los gránulos de los neutrófilos a la membrana plasmática y promueven la movilidad de estos en superficies de colágeno. El veneno, así como la enzima aislada, actuarían causando primero una estimulación no enzimática de los neutrófilos, dando lugar a la activación de la PLA<sub>2</sub> citosólica y a la producción de metabolitos del ácido araquidónico involucrados en la estimulación y posterior desgranulación y motilidad de los neutrófilos. Así pues, el veneno que posee PLA<sub>2</sub>, se une a los fosfolípidos aniónicos expuestos en la superficie de los neutrófilos estimulados, es endocitado, y contribuye a su vez a la producción de quimiocinas responsables de la infiltración de neutrófilos en la zona de la mordedura de la serpiente [Sundell *et al.*, 2003].

La PLA<sub>2</sub> es un importante mediador intra y extracelular de la inflamación que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos esterificados en el segundo carbono (C-2) del glicerol. El ácido araquidónico (AA) se encuentra esterificado en esta posición y la acción de la PLA<sub>2</sub> libera AA para su posterior metabolismo vía COX o LOX [Kim *et al.* 2004].

El método seguido fue el desarrollado por Neves *et al.* (1993). El edema es inducido mediante inyección subcutánea en la aponeurosis plantar trasera derecha de PLA<sub>2</sub> procedente de *Naja mossambica* (1,18 unidades en 25 µL de suero fisiológico), mientras que en la aponeurosis plantar trasera izquierda se inyecta suero salino. 5-O-Desmetilnobiletina es administrado oralmente 1 hora antes de la inyección de PLA<sub>2</sub> a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y la ciproheptadina (10 mg/kg) en un

tampón salino ligeramente basicado para favorecer su absorción (NaCl 0,9%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1%, pH 7,4). El grupo control recibe oralmente tampón salino. El edema se mide como aumento del volumen de la pata mediante un pletismómetro 30, 60 y 90 minutos después de provocar la inflamación y se expresa como la diferencia entre el volumen de la pata derecha y el de la izquierda. La actividad antiinflamatoria se determina como en el ensayo anterior.



**Fig. III.8. Esquema de la inducción y tratamiento del edema por PLA<sub>2</sub>**

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta V_c - \Delta V_p}{\Delta V_c} \times 100$$

$\Delta V_c$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo control,

$\Delta V_p$  = media aritmética del incremento del volumen plantar del grupo problema.

### III.4. Ensayos *in vitro*

#### III.4.1. Células

Las células humanas utilizadas se obtuvieron a partir de hemoderivados suministrados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana. Los leucocitos polimorfonucleares de rata se obtuvieron a partir de ratas Wistar hembras de 180-200 g de la compañía Harlan Interfauna Ibérica, S.L. (Barcelona).

Los macrófagos murinos RAW 264.7 (ECACC, Salisbury, GB) fueron cedidos por el laboratorio de cultivos celulares del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València, libres de micoplasmas.

#### III.4.2. Aparatos y material de laboratorio

Tabla III.5. Material empleado en las pruebas *in vitro*

Agitador	Gyro- Rocker STR 9
Balanza de precisión	Sartorius
Baño termostatazo con agitación	SW 20, Julabo
Baño ultrasonidos	Bransonic 5210
Cámara de contaje	Neubauer <i>improved</i> , Marenfield
Campana de flujo laminar (SCSIE)	Telstar Bio-II-A V6.03
Centrífugas	Eppendorf 5810 R Mikro 200, Hettich
Citómetro de flujo (SCSIE)	Coulter Epics XL-MCL

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Estufa termostataada	Selecta
Filtración	Sistema de ultrafiltración <i>All Glass</i> , Millipore  Filtros de membrana MF 0,45 µm HA, Millipore  Filtros de disco <i>Puradisc 25 nyl</i> , Whatman
Fuente de alimentación para electroforesis	EPS-301, Amersham biosciences
Incubador (SCSIE)	Hepa Class 100, Termo Electrón Corporation
Lector de microplacas	Labsystem Multiskan EX
Microscopios (SCSIE)	Nikon Phase Contrast-2, ELWD 0.3  Nikon Eclipse TE2000-S
pH-metro	Crison pH- 2000
Pipetas automáticas de diferentes volúmenes	Eppendorf Research  Labnet, BioPette  Multicanal BioPette  Repetidora Bibby Step, Bibby Sterilin Ltd.
Pistola cultivos	Bibbyjet, Bibby Sterilin Ltd.
Sistema de extracción en fase sólida	<i>Visiprep</i> , Supelco  Columnas Lichrolut C18, 100 mg, 1 mL, Merck

Sistema HPLC	Bomba de gradiente L-6200 + Detector de fotodiodos L-7455 + Autoinyector L-7200 (Merck- Hitachi) Precolumna Lichrospher C18 (4x4 mm, 5 $\mu$ m), Merck Columna Lichrospher C18 (250x4 mm, 5 $\mu$ m), Merck Válvula de inyección Reodyne Loop 100 $\mu$ L Controlador del sistema HSM- 7000, Merck- Hitachi en un ordenador Pentium 200 MMX Unidad refrigeradora: <i>Frigidor</i> acoplado a un baño termostatado <i>Ultraterm</i> , Selecta.
Sonicador	Branson 150
Unidad de transferencia	HOEFER 70, Amersham
Unidad de electroforesis	HOEFER 260, Amersham
Unidad de electroforesis	Apollo Instrumentation, Continental Lab Products, Inc.

## III.4.3. Reactivos

Tabla III.6. Reactivos empleado en las pruebas *in vitro*

Acetonitrilo (gradiente grade)	J.T. Baker
Ácido araquidónico 99%	Sigma
Ácido trifluoroacético (TFA)	Merck
Acrilamida	Sigma
Agarosa	Sigma
Antibiótico (estreptomina 100 µg/mL y penicilina 100U/mL)	Gibco Invitrogen
Anticuerpo secundario	Sigma
Anticuerpo policlonal anti-COX-2	Cayman
Anticuerpo policlonal anti-NOS-2	Cayman
Azul tripano	Sigma
Azul de bromofenol	Sigma
Bromuro de etidio	Sigma
Colorante de Ponceau	Sigma
<i>Complete tablets Mini EDTA free</i> (inhibidor polivalente de proteasas)	Roche
Componentes tampones	Sigma
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT)	Sigma
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma
Dodecil sulfato sódico (SDS)	Sigma
Enoxaparina sódica (Clexane 60 mg)	Sanofi-Aventis
Etilendiaminotetraacético (EDTA) sódico	Sigma
Ficoll	Amersham biosciences

Fitohemaglutinina (PHA o lectina, de <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Sigma
formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP)	Sigma
5-, 12- y 15-HETE	Sigma
12-HHTrE	Sigma
Ionóforo del calcio A23187	Sigma
Kit detección de apoptosis Annexin V- FITC	BD Pharmingen
Kit EIA de LTB <sub>4</sub> , PGE <sub>2</sub>	Amersham biosciences
Kit ELISA de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10 humano	e-Bioscience
Kit ELISA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ratón	e-Bioscience
Kit EnzoLyte™ AMC Capasa-3	Anaspec
Lipopolisacárido (LPS)	Sigma
Material fungible de laboratorio	Nunc, Sarstedt
Medio DMEM	Gibco Invitrogen
Medio RPMI 1640	Sigma
Metanol calidad Gradiente grade	J.T. Baker
<i>N</i> -terbutoxicarbonil-L-alanina- <i>p</i> -nitrofenil éster (BOC)	Sigma
Patrón Pesos Moleculares pUC18 DNA Dpn I digest	Sigma
Patrones Pesos Moleculares preteñidos	Pierce
PBS estéril	Gibco Invitrogen
Persulfato amónico	Sigma
Película fotográfica Hyperfilm®	Amersham biosciences
Proteinasa K	Sigma

Reactivo de Bradford	Sigma
Reactivo de Griess	Sigma
Reactivo de quimioluminiscencia	Pierce
Ribonucleasa A	Sigma
Suero fetal bovino (SFB)	Gibco Invitrogen
TEMED	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Yoduro de propidio	Sigma

#### III.4.4. Fases móviles para HPLC

Tabla III.7. Fases móviles para HPLC

<b>Fase móvil HPLC elución LTB<sub>4</sub></b>	740 mL de metanol 260 mL de agua ultrafiltrada Desgasificar 15 min 70 µL de TFA Mezclar
<b>Fase móvil HPLC elución 5-, 12-, 15-HETE y 12-HHTre</b>	750 mL de acetonitrilo 250 mL de agua ultrafiltrada Desgasificar 15 min 20 µL de TFA Mezclar

## III.4.5. Disoluciones

Tabla III.8. Disoluciones empleadas en las pruebas *in vitro*

<b>Acrilamida</b>	Acrilamida	73,5 g
	Bis-acrilamida	2,5 g
	H <sub>2</sub> O ultrafiltrada	250 ml
<b>Azul tripano</b>	Azul tripano	0,5 g
	NaCl 0,9%	100 mL
<b>BOC</b>	BOC	3,2 mg
	DMSO	1 mL
<b>Ca<sup>2+</sup> (180 mM)</b>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	264,6 mg
	H <sub>2</sub> O	10 mL
<b>Glucógeno</b>	Glucógeno	1 mg/kg
	PBS	10 mL
<b>Ionóforo de Calcio (190 μM)</b>	Ionóforo de Calcio A23187	1 mg
	DMSO	1 mL
<b>Ionóforo de Calcio (1,9 μM)</b>	Solución de ionóforo de calcio A23187 190μM	100 μL
	PBS	900 μL
<b>MTT</b>	MTT	5 mg
	PBS	10 mL
<b>TPA concentrado</b>	TPA	5 mg
	DMSO	1 mL
<b>TPA diluido</b>	TPA concentrado	13 μL
	PBS	983 μL

## III.4.6. Tampones

Tabla III.9. Tampones empleadas en las pruebas *in vitro*

<b>Solución de Hanks (HBSS) con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup></b>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,2 μM
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,4 μM
	KCl	5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,33 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM
	NaCl	137 mM
	α-D-glucosa	1 mg/mL
	pH= 7,4	
<b>Tampón fosfato salino (PBS) modificado por Dulbecco</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM
	NaCl	137 mM
	pH= 7,27	
<b>Tampón de lisis (I)</b>	Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mM
	KHCO <sub>3</sub>	9,5 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	157 mM
<b>Tampón de lisis (II)</b>	Tritón X-100	1%
	Ácido deoxichólico	1%
	NaCl	20 mM
	Tris	25 mM
	pH= 7,4	
<b>Tampón de lisis (III) EMSA</b>	Totex	
	Hepes pH 7,9	20 mM
	NaCl	350 mM

	glicerol	20% (v/v)
	Nonidet P-40	1% (p/v)
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	EDTA	0,5 mM
	EGTA	0,1 mM
	Ditiotreitol	0,5 mM
	Fluoruro de fenilmetilsulfonil	0,1%
	Aprotinina	1%
<b>Tampón de lisis (IV)</b>	EDTA	100 mM
<b>DNA ladder</b>	Tris- HCl	10 mM
<b>Tampón de carga Azul de Bromofenol</b>	Azul bromofenol	0,25%
	Glucosa	40%
<b>Tampón Tris- EDTA (TE)</b>	Tris	10 mM
	EDTA	1mM
	PH= 7	
<b>Tampón Tris acetato-EDTA (TAE)</b>	Tris acetato	40 mM
	EDTA	1 mM
<b>Tampón D+</b>	Hepes pH 7,9	20 mM
	Glicerol	20% p/v
	KCl	100 mM
	EDTA	0,5 mM
	Nonidet P-40	0,25%
	Ditiotreitol	2 mM
	Fluoruro de fenilmetilsulfonil	0,1%
<b>Tampón F</b>	Ficoll 400	20%
	Hepes	100 mM

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

	KCl	300 mM
	Ditiotreitol	10 mM
	Fluoruro de fenilmetilsulfonil	0,1%
<b>Tampón fosfato sódico 50 mM, EDTA 1mM</b>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8,9 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6,8 g
	EDTA	0,3722 g
	$\text{H}_2\text{O}$	csp 1L
	pH= 7	
<b>Tampón 1 M Tris-HCl</b>	Trizma <sup>®</sup> HCl	157,6 g
	$\text{H}_2\text{O}$ csp	1 L
	pH= 6,8	
<b>Tampón 3 M Tris Base</b>	Trizma <sup>®</sup> Base	363,3 g
	$\text{H}_2\text{O}$ csp	1 L
	pH= 8,7	
<b>Tampón de desarrollo</b>	Trizma <sup>®</sup> Base	48 mM
	Glicina	380 mM
	SDS	3,7 mM
<b>Tampón de transferencia</b>	Trizma <sup>®</sup> Base	24 mM
	Glicina	190 mM
	Metanol	20%

## III.4.7. Geles

Tabla III.10. Composición de geles

<b>Gel de agarosa al 1,5% para electroforesis</b>	Agarosa	0,45 gr
	TAE csp	30 mL
<b>Gel de acrilamida al 10% Running</b>	Solución acrilamida	9 mL
	Tris Base 3M pH=8,7	3,38 mL
	H <sub>2</sub> O	14,7 mL
	SDS 20%	150 µL
	Persulfato amónico	75 µL
	TEMED	7,5 µL
<b>Gel de acrilamida Staking</b>	Soluc. acrilamida	1,3 mL
	Tris HCl 1M pH=6,8	1,45 mL
	H <sub>2</sub> O	7,25 mL
	SDS 20%	100 µL
	Persulfato amónico	50 µL
	TEMED	5 µL

### **III.5. Métodos *in vitro***

#### **III.5.1. Obtención de células**

##### **A. Obtención de neutrófilos de rata**

Según el método descrito por Safayhi *et al.* (1995). La rata se anestesia con halotano. Inmediatamente se inyecta glucógeno en la cavidad peritoneal (1 mg/kg de peso de rata, disuelto en 10 mL de PBS a 37 °C) y se masajea suavemente en el abdomen durante 1 min. Cuatro horas más tarde se anestesia la rata con halotano y se sacrifica mediante dislocación cervical. Se inyecta PBS a 37 °C en la cavidad peritoneal y se masajea durante 5 min. A continuación se recoge el líquido de la cavidad peritoneal y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El *pellet* se lava dos veces, una de ellas con tampón de lisis, para eliminar los posibles eritrocitos contaminantes. Finalmente, las células se resuspenden en HBSS con glucosa (1 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (Cf = 1,20 mM) y MgCl<sub>2</sub> (Cf = 0,40 mM). El recuento de células se realiza en una cámara Neubauer teñidas con azul tripano.

Tabla III.11. Protocolo para la obtención de neutrófilos de rata

Tiempo	Acción
(horas)	En rata
0	Inyectar glucógeno <i>i.p.</i>
4	Sacrificar Inyectar PBS <i>i.p.</i> Recoger líquido de cavidad peritoneal
(min)	En células
0	Centrifugar a 1200 rpm, T ambiente
10	Lavar <i>pellet</i> : 1° lisis, 2° PBS
30	Resuspender <i>pellet</i> en HBSS glucosa, Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup> Recuento

### B. Obtención de neutrófilos humanos

Los neutrófilos se aíslan a partir de *buffys* de sangre humana. La sangre se reparte en tubos falcon y se añade una disolución de dextrano al 3% en suero fisiológico salino. Se deja reposar durante 45-60 min. Se recoge el sobrenadante enriquecido en neutrófilos y se desechan los eritrocitos sedimentados. Se centrifuga a 1300 rpm durante 15 min a 15 °C. El sobrenadante se desecha y el *pellet* se resuspende en un tampón de lisis para eliminar los eritrocitos contaminantes. Se centrifuga de nuevo a 1300 rpm durante 10 min a 15 °C. El *pellet* que queda se resuspende en HBSS con glucosa (1 mg/mL), se añade al Ficoll y se centrifuga a 1500

rpm durante 40 min a 20 °C. En el fondo del tubo quedan los neutrófilos. El sobrenadante se desecha y el *pellet* se resuspende en HBSS con glucosa (1 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (Cf = 1,20 mM) y MgCl<sub>2</sub> (Cf = 0,40 mM). Las células teñidas con azul tripano se cuentan en una cámara Neubauer.

**Tabla III.12. Protocolo para la obtención de neutrófilos humanos**

Tiempo (min)	Acción
0	Dextrano al 3% en suero fisiológico
50	Centrifugar sobrenadante a 1300, 15 °C
65	Resuspender <i>pellet</i> en lisis Centrifugar a 1300, 15 °C
75	Resuspender <i>pellet</i> en HBSS glucosa Añadir al Ficoll, centrifugar a 1500, 20 °C
115	Resuspender <i>pellet</i> en HBSS glucosa, Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Recuento

### C. Obtención de plaquetas de rata

La rata se anestesia con halotano. Se practica un corte justo por encima del diafragma, se inyectan 200 µL de enoxaparina sódica (0,6 mg/Kg) y se corta la arteria aorta, momento en el cual el animal perece. Se recoge la sangre de la cavidad torácica. Se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min a 15 °C y se recoge sin apurar el sobrenadante. Dicho sobrenadante se centrifuga a 1100 rpm durante 5 min a 15 °C y recogemos el sobrenadante en el que tenemos las plaquetas. Las células teñidas con azul tripano se cuentan en una cámara Neubauer.

Tabla III.13. Protocolo para la obtención de plaquetas humanas

Tiempo (min)	Acción
0	Diluir la sangre en PBS (1:10)
10	Centrifugar sobrenadante a 2000 rpm, 15 °C
20	Centrifugar el sobrenadante a 1100 rpm, 15 °C
25	Recoger el sobrenadante rico en plaquetas Recuento

#### D. Obtención de linfocitos humanos

Según el método propuesto por Kuo *et al.* (2003). La sangre de los *buffys* se diluye en PBS (1:10) y se adiciona al Ficoll (15 mL de sangre y 10 mL por falcon). Se centrifuga a 2000 rpm durante 30 min y se recogen los linfocitos de la interfase que se llevan a un medio RPMI-1640, se centrifugan a 2000 rpm para quitarles el resto de Ficoll y finalmente se llevan a un medio RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina y antibiótico (estreptomina 100 µg/mL y penicilina 100U/mL) al 1%. Se siembran en un frasco durante 3 h para que queden adheridos los monocitos. Se recoge el medio con linfocitos y se pasa por el citómetro para ver el grado de pureza (≈90% de pureza).

Tabla III.13. Protocolo para la obtención de linfocitos humanos

Tiempo (min)	Acción
0	Diluir la sangre en PBS (1:10) Adicionar al Ficoll
10	Centrifugar sobrenadante a 2000 rpm, 18 °C
40	Recoger la interfase. Lavar con RPMI y centrifugar a 2000 rpm, 18 °C
45	Resuspender los linfocitos en medio completo. Sembrar en placa
225	Pasar por el citómetro Recuento

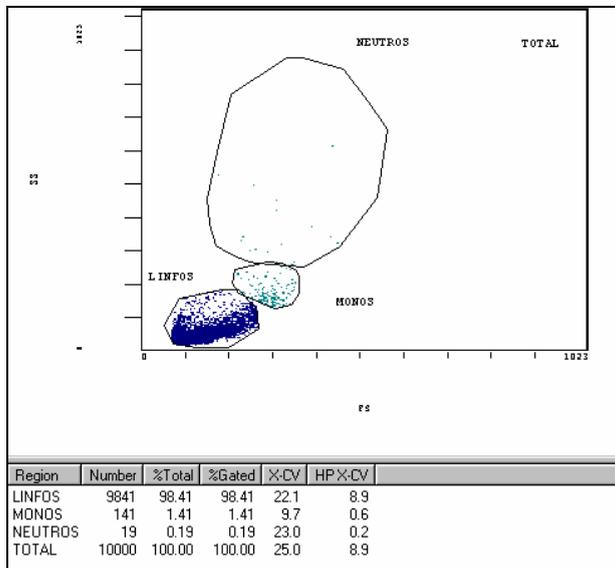
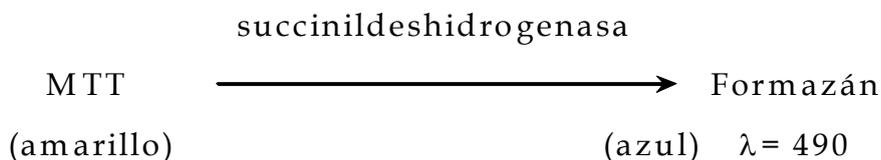


Fig III.9. Histograma de poblaciones celulares. La pureza de linfocitos es cercana al 90%

### III.5.2. Ensayo de citotoxicidad

Se siguió el protocolo descrito por Mosmann (1983). Es un ensayo colorimétrico y basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT) a formazán mediante una reacción catalizada por succinildeshidrogenasas mitocondriales.



Las células se siembran en placas de 96 pocillos. Se añaden 5  $\mu\text{L}$  de los productos: 5-O-desmetilnobiletina ( $C_f = 10\text{-}2,5 \mu\text{M}$ ), escropoliósido A ( $C_f = 100\text{-}25 \mu\text{M}$ ), escrovalentinósido ( $100\text{-}25 \mu\text{M}$ ) o DMSO al 0,5%. Tras incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$ , se elimina el medio y se añaden 100  $\mu\text{L}$  MTT (0,5 mg/mL). Cuando aparecen los depósitos de color azul, se elimina todo el líquido y se añaden 100  $\mu\text{L}$  DMSO para que disuelva los cristales de formazán, midiendo la absorbancia a 490 nm.

**Tabla III.14. Protocolo para el ensayo de citotoxicidad**

	<b>Control</b>	<b>Muestra o problema</b>
<b>Células</b>	1 x 10 <sup>6</sup> células /195 µL PBS	1 x 10 <sup>6</sup> células/195 µL PBS
<b>DMSO</b>	5 µL	-
<b>Fármaco</b>	-	5 µL
Incubar a 37 °C, 1 -3 h Centrifugar a 3000 rpm, 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
<b>MTT</b>	100 µL	100 µL
Incubar a 37 °C, 1-3 h Centrifugar a 3000 rpm, 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
<b>DMSO</b>	100 µL	100 µL
Agitar y llevar a ultrasonidos. Medir la absorbancia a 490 nm		

La viabilidad celular se determina según la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{A_p}{A_c} \times 100$$

A<sub>p</sub> = media aritmética de la absorbancia de la muestra o problema

A<sub>c</sub> = media aritmética de la absorbancia del control

Tabla III.15. Células utilizadas en el estudio de citotoxicidad

	Macrófagos (RAW 264.7)	Linfocitos humanos	Neutrófilos humanos	Neutrófilos de rata
Células/mL	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
Tiempo de incubación (h)	24	72	1-3	1-3

### III.5.3. Ensayo de liberación / actividad elastasa

Método basado en el descrito por Barret (1981). Para el ensayo de liberación los neutrófilos humanos se resuspenden en 0,5 mL de HBSS con glucosa (1mg/mL),  $\text{CaCl}_2$  (Cf = 1,20 mM) y  $\text{MgCl}_2$  (Cf = 0,40 mM), de forma que la relación sea de  $1,25 \times 10^6$  células/mL. Se incuba a 37 °C durante 5 min. Pasado este tiempo se añaden 5  $\mu\text{L}$  de los productos: 5-*O*-desmetilnobiletina (Cf = 10 y 5  $\mu\text{M}$ ), escropoliósido A y escrovalentinósido (Cf = 100 - 25  $\mu\text{M}$ ) o 5  $\mu\text{L}$  de DMSO al 0,5% (vehículo) al control y se incuba durante 5 min a 37 °C. La liberación de elastasa se estimula por la adición de 10  $\mu\text{L}$  de citocalasina (Cf = 10  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Cf = 10 nM) 5 min más tarde. Después de 30 min de incubación a 37 °C, las muestras se disponen en un baño de hielo y posteriormente se centrifugan a 4000 rpm durante 10 min a 0 °C. Alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes se llevan a una placa de 96 pocillos, se añaden 5  $\mu\text{L}$  de *N*-terbutoxicarbonil-L-alanina-*p*-nitrofenil éster (BOC) (20  $\mu\text{M}$ ) en cada pocillo y de nuevo se incuba durante 30 min a 37 °C. La absorbancia se mide a 414 nm.

Con el fin de establecer la posible actividad de los productos en estudio sobre la elastasa liberada y no sobre su liberación, se realiza otro experimento en el que se resuspenden en un falcon  $1,25 \times 10^6$  neutrófilos/mL en 0,5 mL de HBSS con glucosa (1 mg/mL),  $\text{CaCl}_2$  (Cf = 1,20 mM) y  $\text{Mg Cl}_2$  (Cf = 0,40 mM) por cada concentración del producto que se va a ensayar. Se incuba a 37 °C durante 5 min. Se adicionan 10  $\mu\text{L}$  de citocalasina (10  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de fMLP (10 nM) 5 min más tarde. Después de 30 min de incubación a 37 °C, las muestras se dejan en hielo y posteriormente se centrifugan a 4000 rpm durante 10 min a 0 °C. Las alícuotas (200  $\mu\text{L}$ ) de los sobrenadantes se llevan a una placa de 96 pocillos, se tratan con las diferentes concentraciones de los productos en estudio y se incuban 15 min a 37 °C. Se añaden 5  $\mu\text{L}$  de BOC (20  $\mu\text{M}$ ) en cada pocillo y se deja durante 30 min a 37 °C. La absorbancia se mide a 414 nm.

Tabla III.16. Protocolo para el ensayo de la liberación de elastasa

Tiempo (min)	Acción
0	Células (baño a 37 °C)
5	Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DMN (10-5 µM) 5 µL SC (100-25 µM) 5 µL SV (100-25 µM)
20	10 µL de citocalasina (10 µM)
25	10 µL de fMLP (10 nM) Incubar a 37 °C
55	Poner las muestras en hielo
60	Centrifugar 4000 rpm, 0 °C.
70	Recoger alícuotas de 200 µL Añadir 5 µL BOC (20 µM) Incubar a 37 °C
100	Medir absorbancia a 414 nm

**Tabla III.17. Protocolo para el ensayo de actividad elastasa**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Acción</b>
0	Células (baño a 37 °C)
5	10 µL de citocalasina (10 µM)
10	10 µL de fMLP (10 nM) Incubar a 37 °C
55	Poner las muestras en hielo
60	Centrifugar 4000 rpm, 0 °C.
70	Recoger alícuotas de 200 µL Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DMN (10-5 µM) 5 µL SC (100-25 µM) 5 µL SV (100-25 µM)
85	Añadir 5 µL BOC (20 µM) Incubar a 37 °C
115	Medir absorbancia a 414 nm

### III.5.4. Efecto sobre la actividad de la 5-LOX en PMNs de rata

Se siguió el protocolo descrito para la obtención de neutrófilos de rata. Se realizaron dos experimentos en paralelo. En el primero se emplea la célula entera y en él se determina el efecto de los productos de estudio sobre la producción de eicosanoides. En el segundo ensayo las células son homogenizadas y se aísla la 5-LOX evaluando el efecto directo de los productos en estudio sobre dicha enzima [Safayhi *et al.*, 1995].

#### A. Ensayo en célula entera

A  $5 \times 10^6$  de células se les adicionan los compuestos a las distintas concentraciones, los controles reciben 5  $\mu$ L de DMSO al 0,5% y un testigo positivo a base de zileuton (Cf = 0,5  $\mu$ M), 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 10- 0,1  $\mu$ M), escropoliósido A y escrovalentinósido (Cf = 100-25  $\mu$ M). Tras incubar 10 min se añaden 14  $\mu$ L de ionóforo del calcio A23187 (Cf = 2,5  $\mu$ M). La reacción se detiene a los 15 min en un baño de hielo añadiendo 1 mL de la mezcla MeOH: HCl (97:3) que se encuentra a una temperatura de -20 °C.

Tabla III.18. Protocolo para el ensayo de actividad 5-LOX

Tiempo (min)	Acción
0	Células (baño a 37 °C)
5	Productos: 10 µL DMSO al 0,5% (controles) 10 µL zileuton (0,5 µM) 10 µL DMN (10-0,1 µM) 10 µL SC (100-25 µM) 10 µL SV (100-25 µM)
10	14 µL ionóforo de calcio A23187 (2,5 µM)
25	Fin de la reacción: MeOH: HCl (97:3) + Frío

### B. Ensayo en homogenado celular

Las células resuspendidas en tampón fosfato sódico 50 mM, EDTA 1mM son sonicadas en un baño de hielo (3 veces  $\times$  5 s), comprobando mediante tinción con azul tripano la ausencia de células enteras. Seguidamente se centrifuga a 7500 rpm durante 10 min a 4 °C y se toma el sobrenadante que se centrifuga a 12000 rpm durante 30 min a 4°C y se desecha el *pellet*. A partir de este último sobrenadante se realiza el ensayo de actividad 5-LOX. Se toman alícuotas correspondientes a  $1 \times 10^7$  células y son llevadas hasta un volumen final de 965 µL del tampón. A continuación se adicionan 10 µL de ATP (Cf = 1 mM) y 10 µL de CaCl<sub>2</sub> (Cf = 1,8 mM) y se deja incubar durante 5 min a 37 °C. Se añaden los

compuestos a las distintas concentraciones zileuton ( $C_f = 0,5 \mu\text{M}$ ), 5-*O*-desmetilnobiletina ( $C_f = 10,0 - 0,1 \mu\text{M}$ ) y se dejan incubando 5 min. Pasado este tiempo se añade el ácido araquidónico ( $C_f = 20 \mu\text{M}$ ) dejando actuar la enzima sobre el sustrato durante 5 min, tras lo cual se detiene la reacción de igual forma que en el apartado anterior.

**Tabla III.19. Protocolo para el ensayo de inhibición de la 5-LOX**

Tiempo (min)	Acción
0	Sobrenadante + ATP + $\text{Ca}^{2+}$ (baño a $37^\circ\text{C}$ )
5	Productos: 10 $\mu\text{L}$ DMSO al 0,5% (controles) 10 $\mu\text{L}$ zileuton ( $0,5 \mu\text{M}$ ) 10 $\mu\text{L}$ DMN ( $10-0,1 \mu\text{M}$ )
10	10 $\mu\text{L}$ ácido araquidónico ( $20 \mu\text{M}$ )
15	Parada de la reacción: MeOH: HCl (97:3) + Frío

La cuantificación de  $\text{LTB}_4$  se lleva a cabo de la misma forma en los sobrenadantes tanto de célula entera como de homogenado. A continuación se procesan las muestras mediante columnas RP-18 (Lichrolut C18 columna, 100 mg, 1 mL, Merck; en un Visiprep, Supelco). Para ello se sigue el protocolo de Werz *et al.* [1998]. Primero se centrifugan las muestras 5 min a 8500 rpm a  $4^\circ\text{C}$  y se pasan los 2 mL de sobrenadante por las columnas que previamente fueron activadas pasando 1 mL de MeOH 100% seguido de 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Después se pasa 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  que arrastrará los compuestos de polaridad alta, 1 mL de

MeOH al 25% que se llevará a los de polaridad media y finalmente recogeremos la muestra que contiene compuestos no polares y eicosanoides en 300  $\mu$ L de MeOH 100%.

Se realizan cuatro controles para asegurar que hay liberación de LTB<sub>4</sub>. Antes de cuantificar el metabolito por enzimoimmunoensayo, se confirma que hay producción de LTB<sub>4</sub> en controles y ausencia en células sin estimular mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los eicosanoides purificados en fase sólida se inyectan en el cromatógrafo (100  $\mu$ L) y se separan mediante una elución isocrática con la fase móvil MeOH al 74% TFA 0.007%, flujo 1 mL/min y presión 200 bar [Safayhi *et al.*, 1995]. La cuantificación del LTB<sub>4</sub> se combinó con EIA porque a la longitud de onda a la que se detecta el metabolito el flavonoide absorbe y el tiempo de retención es muy similar por lo que los picos se solapan. Se procede a cuantificar dicho metabolito por el test inmunoenzimático operando según las instrucciones del fabricante. En esta prueba, se coloca el anticuerpo monoclonal de ratón específico en los pocillos de una placa de microtitulación. El anticuerpo queda adsorbido en las paredes, sensibilizando la placa. Después se añade a cada pocillo la muestra que debe contener el antígeno de prueba (LTB<sub>4</sub>). Si el antígeno reacciona con el anticuerpo, éste queda retenido. A continuación se añade a cada pocillo un conjugado de enzima-antígeno (LTB<sub>4</sub>-acetilcolinesterasa, LTB<sub>4</sub> *tracer*) específico del anticuerpo y seguidamente el antisuero de LTB<sub>4</sub>. El método se basa en la competición entre el LTB<sub>4</sub> de la muestra y el LTB<sub>4</sub> *tracer* por una cantidad limitada de antisuero de LTB<sub>4</sub>. La cantidad de LTB<sub>4</sub> *tracer* es constante, mientras que la del LTB<sub>4</sub>

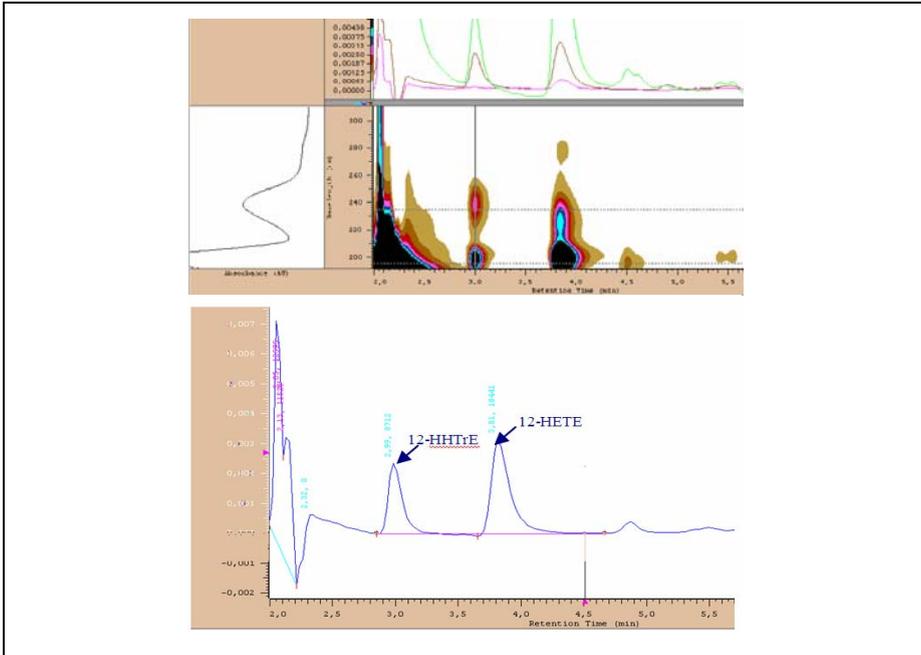
es variable, por eso la cantidad de LTB<sub>4</sub> *tracer* que es capaz de unirse al antisuero de LTB<sub>4</sub> es inversamente proporcional a la concentración de LTB<sub>4</sub> del pocillo. Se lava la placa para eliminar el antígeno libre y a continuación se añade el reactivo de Ellman, que contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa. El producto de esta reacción es de color amarillo y absorbe a 412 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de LTB<sub>4</sub> *tracer* unido y por lo tanto es inversamente proporcional a la cantidad de LTB<sub>4</sub> unido.

### III.5.5. Efecto sobre la actividad COX-1 y 12-LOX en plaquetas de rata

Se sigue el protocolo de Safayhi *et al.* [1995]. La actividad COX-1 y 12-LOX se mide atendiendo a la producción de ácido 12- hidroxihexadecatrienóico (12-HHTrE) y ácido 12- hidroxieicosatetraenoico (12-HETE), respectivamente. Se colocan 80× 10<sup>6</sup> células por vial y se añade HBSS con glucosa (1 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (Cf = 1,8 mM) y MgCl<sub>2</sub> (Cf = 0,40 mM) y hasta 985 µL y se deja incubar durante 5 min a 37 °C. Los compuestos se añaden a las distintas concentraciones: controles DMSO al 0,5%, el inhibidor de COX y LOX ácido 5, 8, 11, 14- eicosatetraenoico (EYTA) (Cf = 2,5 µM), el inhibidor inespecífico de LOX ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Cf = 2,5 µM) y 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 10- 0,1 µM) y se incuban durante 10 min. Pasado este tiempo se añade el ionóforo del calcio A23187 (Cf = 2,5 mM) que estimula la producción de 12-HHTrE y 12-HETE. A los 5 min se detiene la reacción de igual forma que en el apartado 3.4.3.d.

Las muestras son procesadas como se describió anteriormente

analizándolas posteriormente por HPLC. Para poder cuantificar la producción de metabolitos se realizó una curva patrón de cada uno de ellos. Tras inyectar la muestra se procede a la elución de 12-HHTrE y 12-HETE mediante una fase móvil de acetonitrilo-agua (75:25), TFA 0,002%, flujo 1 mL/min y presión de 60 bar.



**Fig III.10. Cromatograma de eicosanoides procedentes de una mezcla para HPLC. En este experimento se obtienen las áreas de los picos para 12-HETE y 12-HHTrE, que son los metabolitos de 12-LOX y COX-1 respectivamente.**

Una vez obtenidos los cromatogramas y las correspondientes áreas de cada pico, se calcula la cantidad de metabolito mediante interpolación en las respectivas curvas patrón. La media de los valores del control inicial y final de una serie será el 100% de producción de cada metabolito en dicha serie. Los valores de las muestras se refieren a este valor para

obtener los porcentajes de inhibición respecto del control. Las muestras que no recibieron estímulo son la basal y sirven para saber si el ensayo es significativo al compararlo con el control.

**Tabla III.20. Protocolo para el ensayo de actividad COX-1 y 12-LOX**

Tiempo (min)	Acción
0	Células (baño a 37 °C)
5	Productos: 10 µL DMSO al 0,5% (controles) 10 µL EYTA (2,5 µM) 10 µL NDGA (2,5 µM) 10 µL DMN (10-0,1 µM)
15	14 µL ionóforo de calcio A23187 (2,5 µM)
20	Fin de la reacción: MeOH: HCl (97:3) + Frío

### III.5.6. Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos (RAW 264.7)

El óxido nítrico tiene un papel muy relevante en la dermatitis promocionando la respuesta inflamatoria en el tejido, ya que produce vasodilatación y la consiguiente atracción de neutrófilos a la zona.

Los nitritos se determinan en el sobrenadante utilizando el reactivo de Griess (*N*-1-naftilendiamina (NED) al 0,1% en H<sub>2</sub>O y sulfanilamida al 1% en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). La reacción de detección se basa en una reacción de diazotización en la cual el agente N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, generado de la autooxidación del

NO o de la acidificación de  $\text{NO}_2^-$ , reacciona con la sulfanilamida para dar lugar a un derivado de diazonio que reacciona con NED. Se forma un producto coloreado diazo que absorbe fuertemente a 540 nm y se determina espectrofotométricamente [Tarpey *et al.*, 2004].

Basado en el método de De León *et al.* (2003). Se realiza una curva estándar de concentraciones conocidas de nitrito para interpolar en dicha curva los valores de absorbancia obtenidos para cada pocillo y poder conocer las concentraciones de nitrito liberadas en el medio. Se siembran  $1 \times 10^6$  células/mL en una placa de 96 pocillos y se incuban 24 h para que la población se doble. Se elimina el medio y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de medio fresco sin suero fetal bovino (SFB). Se añade DMSO al 0,5% para el control y blanco, DMN (Cf = 10- 1,25  $\mu\text{M}$ ), SC y SV (Cf = 100-25  $\mu\text{M}$ ) y dexametasona (Cf = 25  $\mu\text{M}$ ) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en  $\text{CO}_2$  durante 3 h. La liberación de NO se estimula mediante la adición de 20  $\mu\text{L}$  de LPS (Cf = 1 $\mu\text{g}$ /mL). Se toman alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a las 24 h y se disponen en otra placa de 96 pocillos, añadiendo 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess. Se mide la absorbancia a 490 nm.

Tabla III.21. Protocolo para el ensayo de actividad iNOS

Tiempo (h)	Acción
0	Sembrar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
24	Cambiar medio Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DXM (25 µM) 5 µL SC (100–25 µM) 5 µL SV (100–25 µM) 5 µL DMN (10–1,25 µM)
27	20 µL LPS
51	100 µL sobrenadante + 100 µL reactivo de Griess Medir absorbancia a 490 nm

### III.5.7. Efecto sobre la actividad COX-2 en RAW 264.7

Se siembran  $1 \times 10^6$  células/mL en una placa de 96 pocillos y se dejan incubar 24 h para que la población se doble. Se elimina el medio y se añaden 200 µL medio fresco sin SFB. Se añade DMSO al 0,5% para el control y el blanco, 5-*O*-desmetilnobiletina (Cf = 10-2,5 µM), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100-25 µM) y dexametasona (Cf = 25 µM) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub> durante 3 h. Las células se estimulan mediante la adición de 20 µL de LPS (Cf = 1 µg/mL).

Se procede a cuantificar la PGE<sub>2</sub> liberada por la COX-2 mediante un test inmunoenzimático (EIA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En esta prueba, se coloca el anticuerpo monoclonal de ratón específico en los pocillos de una placa de microtitulación. El anticuerpo queda adsorbido en las paredes, sensibilizando la placa. Después se añade a cada pocillo la muestra que debe contener el antígeno de prueba (PGE<sub>2</sub>). Si el antígeno reacciona con el anticuerpo, éste queda retenido. A continuación se añade a cada pocillo un conjugado de enzima-antígeno (PGE<sub>2</sub>-acetilcolinesterasa, PGE<sub>2</sub> *tracer*) específico del anticuerpo y seguidamente el suero de PGE<sub>2</sub>. El método se basa en la competición entre el PGE<sub>2</sub> de la muestra y el PGE<sub>2</sub> *tracer* por una cantidad limitada de anticuerpo de PGE<sub>2</sub>. La cantidad de PGE<sub>2</sub> *tracer* es constante, mientras que la del PGE<sub>2</sub> es variable, por eso la cantidad de PGE<sub>2</sub> *tracer* que es capaz de unirse al anticuerpo de PGE<sub>2</sub> es inversamente proporcional a la concentración de PGE<sub>2</sub> del pocillo. Se lava la placa para eliminar el antígeno libre y a continuación se añade el reactivo de Ellman, que contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa. El producto de esta reacción es de color amarillo y absorbe a 412 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de PGE<sub>2</sub> *tracer* unido y por lo tanto es inversamente proporcional a la cantidad de PGE<sub>2</sub> unido.

Tabla III.22. Protocolo para el ensayo de actividad COX-2

Tiempo (h)	Acción
0	Sembrar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
24	Cambiar medio Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DXM (25 µM) 5 µL SC (100–25 µM) 5 µL SV (100–25 µM) 5 µL DMN (10–1,25 µM)
27	20 µL LPS
51	Recoger el sobrenadante y realizar el EIA

### III.5.8. Inhibición de la expresión iNOS y COX-2 en RAW 264.7

#### A. Tratamiento y estimulación de los macrófagos

Se siembran  $1 \times 10^6$  células en 2 mL de medio DMEM completo con suero fetal bovino al 0,5% en placas de 6 pocillos. A las 24 h se retira el medio y se añade 1,5 mL de medio DMEM sin suero. Se añaden los productos a las concentraciones finales de: control y blanco (DMSO al 0,5%), 5-O-desmetilnobiletina (10 - 2,5 µM), escrovalentinósido y escropoliósido A (100 - 50 µM) y dexametasona (5 µM) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub> durante 3 h. Pasado este tiempo se estimula con 150 µL de LPS (Cf = 1 µg/mL). A las 18 h se retira el medio, se lisan las células con un tampón de lisis y se extrae la proteína.

#### **B. Cuantificación de proteínas**

Se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min y se recoge el sobrenadante, donde se mide la proteína mediante el reactivo de Bradford.

El reactivo de Bradford está compuesto por azul de Coomassie, el cual reacciona con las proteínas dando coloración azul-violeta que se cuantifica midiendo la absorbancia.

Una alícuota de la muestra se diluye 1:10 y 10  $\mu$ L de la misma (por duplicado) se añaden a una placa de 96 pocillos. Posteriormente se adicionan 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford y tras 15 min se mide la absorbancia a 595 nm. Para calcular la concentración de proteínas que hay en cada muestra se realiza una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA en la que se interpolan los valores obtenidos para cada muestra problema.

#### **C. Western blotting**

La separación de proteínas se realiza mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas se separan en función de su tamaño molecular ya que se tratan con un agente desnaturizante (DTT) y un detergente cargado negativamente (SDS) que se une y envuelve a las proteínas de forma proporcional al peso que éstas tienen. Al establecer una diferencia de potencial, las proteínas se desplazan hacia el ánodo. Una vez separadas, las proteínas

se transfieren a una membrana donde pueden ser detectadas mediante el cuerpo de antígenos específicos.

Los geles preparados están formados por dos partes, la parte concentradora o *stacking* gel y la parte separadora o *running* gel. El gel separador se puede preparar con diferentes proporciones de acrilamida y bisacrilamida (7,5%, 10%, 12,5%, 15%) para obtener diferentes tamaños de poro y diferente separación de las proteínas. Se preparan geles al 10% de acrilamida (ver Tabla III.10. Composición de geles). Se mezcla bien la solución y se vierte entre los cristales acoplados al *caster*. Sobre la superficie de dicha solución se añade agua y se deja a T ambiente hasta que polimeriza completamente, entre 30-45 min.

A continuación se elabora el gel concentrador (ver Tabla III.10. Composición de geles). Se elimina en agua que habíamos añadido sobre el gel separador, se le añade la solución del gel concentrador hasta arriba de los cristales, se coloca el peine y se deja polimerizar.

Una vez cuantificada la concentración de proteínas que contiene cada una de las muestras a ensayar, se alicuotan y se hierven durante 3-5 min a 100 °C con el tampón desnaturizante (5:1, v/v). En ese momento, las muestras están ya preparadas para realizar la electroforesis.

Se disponen 30 µg de proteína en un gel de poliacrilamida al 10% y se corre durante 90 min a 100 V. Posteriormente se transfiere a una membrana de nitrocelulosa durante 90 min a 125 mA. Para comprobar que se ha transferido bien se utiliza el colorante Ponceau. Seguidamente

se realiza un lavado con PBS- Tween 20 al 0,05% y después se deja durante 90 min en una solución *blocking* formada por PBS-Tween 20 al 0,05% y leche desnatada al 5% p/v. Pasado este tiempo, se retira este medio y se añade el anticuerpo anti-COX-2 (1:2000) o el anticuerpo anti-iNOS (1:2000) en PBS-Tween 20 al 0,05% y se deja toda la noche a 4 °C en el agitador. La  $\beta$ - actina (1:10000) se usa como control interno para normalizar las diferencias en las cantidades de proteínas entre las diferentes muestras. Se realizan 3 lavados y se añade el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa (1:12000) y se deja durante 90 min. Posteriormente se realizan 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% durante 10 min cada uno. Finalmente se añade el reactivo de quimioluminiscencia, se deja actuar 15 min y se revela mediante unas membranas Hyperfilm ECL.

La intensidad de las bandas se cuantifica densitométricamente utilizando el programa *Scion Image beta 3b*. El valor de la densidad de cada mancha se divide por el de la  $\beta$ - actina, con el fin de obtener datos normalizados, se le sustrae el valor del blanco y se calcula el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\overline{Dc} - \overline{Dp}}{\overline{Dc}} \times 100$$

$\overline{Dc}$  = media aritmética de la densidad de la mancha del control

$\overline{Dp}$  = media aritmética de la densidad de la mancha de la muestra  
problema

Tabla III.23. Protocolo para el ensayo de la inhibición de iNOS y COX-2

Tiempo	Acción
0	Sembrar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
24 h	Cambiar medio Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DXM (5 µM) 5 µL SC (100–50 µM) 5 µL SV (100–50 µM) 5 µL DMN (10–2,5 µM)
27 h	150 µL LPS
45 h	Lisar células Centrifugar a 10000 rpm
45h 10 min	Bradford en sobrenadante
<b>Western Blot</b>	
Tiempo (min)	Acción
0	Cargar 30 µg proteína en gel Correr el gel a 100 V y 400 mA.
90	Transferir a membrana a 120 mA
180	Comprobar con Ponceau Lavado y blocking de leche desnatada al 5%
270	Anticuerpo anti-COX-2 (1:2000) o anti-iNOS (1:2000) en PBS-Tween 0,05%. Incubar toda la noche a 4 °C
<b>Tiempo (min.)</b>	

0	Lavar, añadir 2º anticuerpo (1:12000)
90	Lavar, añadir reactivo quimioluminiscencia y revelar en película fotográfica

### III.5.9. Ensayo de movilidad electroforética en RAW 264.7

El método de movilidad electroforética permite realizar el estudio de las interacciones del ADN con proteínas. Esta prueba se basa en la separación del ADN libre de los complejos formados por ADN y proteínas, gracias a las diferencias en su movilidad electroforética en geles de agarosa o poliacrilamida no desnaturalizados. De esta forma, si la proteína de interés se encuentra unida al ADN pesará más y correrá menos que el ADN libre. Podremos comparar nuestra muestra con un control de ADN unido a la proteína en cuestión.

El método empleado fue desarrollado por Petrovic *et al.* (2003). Se siembran  $1 \times 10^6$ /mL células en 6 mL de medio DMEM completo. A las 24 h se retira el medio y se añaden 6 mL de medio DMEM sin suero. Se añade DMSO al 0,5% para el control y blanco, 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 10  $\mu$ M), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100- 50  $\mu$ M) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub> durante 4 h y se estimula con LPS (concentración final 1  $\mu$ g/mL). Pasada 1 h se recogen las células, y se procede a la extracción de la proteína nuclear. Se lavan los macrófagos una vez con PBS frío y se resuspende en 4 volúmenes respecto al de células en un tampón Totex detergente con alta concentración en sales. El lisado celular se incuba durante 30 min en hielo y se centrifuga a 11000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se determina el

contenido en proteína del sobrenadante mediante Bradford de igual forma que se hizo en el apartado anterior. Se añade la misma cantidad de proteína (15 µg) a la mezcla de la reacción que contiene 20 µg de albúmina bovina, 2 µg de poly(dI-dC), 2 µL de tampón D+, 4 µL de tampón F y 100000 c.p.m. de oligonucleótido marcado con [<sup>32</sup>P] en un volumen de 20 µL. Se incuban las muestras durante 25 min a temperatura ambiente. Los oligonucleótidos del NF-κB se marcan con [<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) y una cinasa T4 polinucleótido. La electroforesis se desarrolla en un gel de poliacrilamida al 4% no desnaturalizado en tampón TBE a pH 8,0. Posteriormente se revela en un film de Kodak XAR-5.

#### **III.5.10. Inhibición de la proliferación linfocitaria**

Una respuesta inmunitaria exagerada produce inflamación del tejido dañándolo, llegando incluso a desencadenar enfermedades como la dermatitis por contacto. La activación y expansión clonal de los linfocitos juegan un papel importante en el desarrollo de respuestas inmunitarias. La interacción de los linfocitos con antígenos o fitohemaglutinina (PHA) inicia una cascada de procesos bioquímicos y la expresión de genes que inducen a los linfocitos que están en reposo a entrar en el ciclo celular, proliferar y diferenciarse. Aunque la mayoría de las observaciones apoyan la tesis de que la estimulación ocurre fundamentalmente sobre los linfocitos T, existen partidarios de que las poblaciones de linfocitos B también son estimuladas pero en menor medida. No obstante, se considera que la proliferación y diferenciación de células B necesita de la presencia de subpoblaciones de linfocitos Th

que serían inducidos por PHA [Shankey *et al.*, 1981; Clement *et al.*, 1983; Wimer, 1997].

El PHA forma parte de la fracción proteica de la legumbre *Phaseolus vulgaris* y tiene la propiedad de aglutinar tanto a hematíes como a leucocitos. Esta lectina se comprende de cinco glicoproteínas tetraméricas formadas por dos polipéptidos, L de leucocito y E de eritrocito. Las subunidades E son responsables de la eritroaglutinación y muestran muy poca actividad mitogénica, mientras que las L confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y su actividad mitogénica es máxima [Felsted *et al.*, 1981]. Actúa uniéndose a determinados oligosacáridos y estimula la mitosis de diferentes estirpes celulares, entre ellas los linfocitos [Hamelryck *et al.*, 1996]; en los que también actúa sobre los procesos bioquímicos relacionados con la respuesta inmune [Kawashima *et al.*, 1998], con la apoptosis y con la proliferación linfocitaria [Posmantur *et al.*, 1998].

Protocolo establecido por Kuo *et al.* (2003). Los linfocitos se obtienen según el método previamente citado. En una placa de 96 pocillos se siembran  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 completo. Se añaden los productos, control y blanco (DMSO al 0,5%), 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 10,00 - 1,25  $\mu$ M), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100 - 25  $\mu$ M) y dexametasona (Cf = 5  $\mu$ M) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub> durante 3 h. A continuación las células son estimuladas añadiendo 10  $\mu$ L de PHA (Cf = 25  $\mu$ g/mL). Se incuba a 37 °C durante 3 días. Se añaden 25  $\mu$ L de MTT a

cada pocillo a una concentración de 5 mg/mL de forma que la concentración final sea de 0,5 mg/mL. Se deja incubar durante 3 h a 37 °C. Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µL de DMSO. La absorbancia se mide a 490 nm.

**Tabla III.24. Protocolo para el ensayo de proliferación linfocitaria**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Acción</b>
<b>0</b>	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
<b>3</b>	Sembrar células Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DXM (5 µM) 5 µL SC (100–25 µM) 5 µL SV (100–25 µM) 5 µL DMN (10–1,25 µM)
<b>6</b>	10 µL PHA (25 µg/mL)
<b>99</b>	25 µL MTT (0,5 mg/mL)
<b>102</b>	Centrifugar 1500 rpm 5 min, eliminar sobrenadante 100 µL DMSO Medir absorbancia a 490 nm

### III.5.11. Efecto sobre el ciclo celular en linfocitos humanos

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico y se basa en hacer pasar una suspensión de partículas o células, alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales

que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Éstos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula como aquellos relacionados con características intrínsecas de la célula (su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma) o aquellos parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula, es decir el inmunofenotipo.

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos, señales de dispersión y de fluorescencia.

La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, es decir la complejidad. La medida proporcional al tamaño de la célula que produce la dispersión viene dada por el *Forward Scatter* (FSC), donde la luz es dispersada en un ángulo cónico pequeño (0-10°) que casi coincide con la dirección de la luz incidente. La luz dispersada en un ángulo de 90° o *Side Scatter* (SSC) es proporcional a la complejidad de la estructura interna celular.

Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda y emite a una longitud mayor. Cuando el fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser,

emite energía radiante. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina *Stokes shift*. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno-anticuerpo marcados con un fluorocromo en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula. Un ejemplo es el yoduro de propidio que es un agente intercalante del ADN y permite analizar estequiométricamente el contenido del ADN celular.

Una vez visto que los productos tienen efecto sobre la proliferación celular, se plantea el estudio de cómo afectan al ciclo celular. Para ello se llevan a cabo dos experimentos basados en el método descrito por Kuo *et al.* (2003). En el primero de ellos se emplean distintas concentraciones, siendo tiempo de exposición constante. Con este ensayo se pretende averiguar si la inhibición de la proliferación es consecuencia de la apoptosis, es decir un incremento del pico sub G<sub>0</sub>, y a su vez un rápido vistazo a la situación de los otros picos. Una vez se descarta la apoptosis como causa de la inhibición de la linfoproliferación y se ve que los productos afectan a la progresión del ciclo celular, cabe resolver la incógnita de a qué tiempo de exposición los productos ejercen su efecto sobre las células.

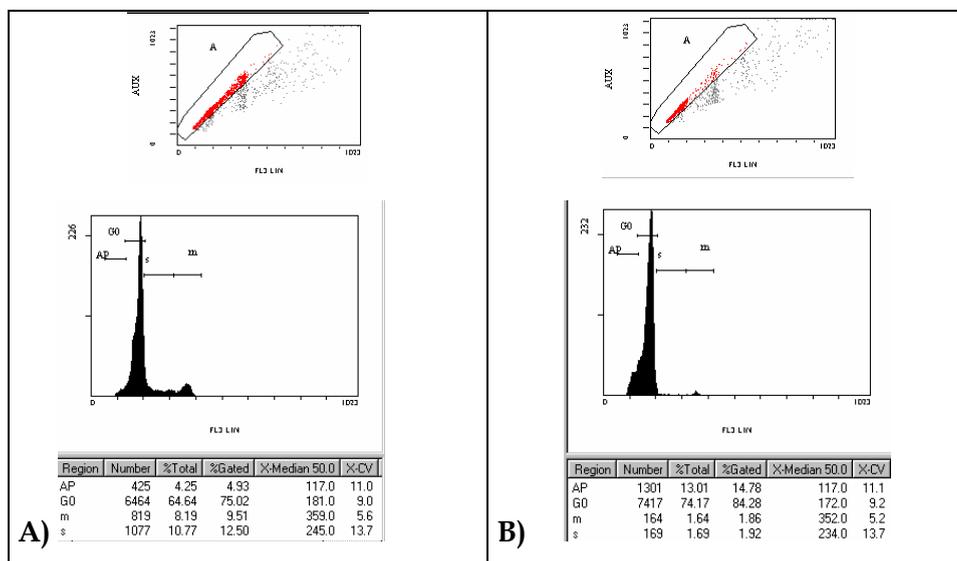
#### **A. Ensayo en función de la concentración de los productos**

Los linfocitos se obtienen según el protocolo previamente citado. Se suspenden  $1 \times 10^6$  células/mL en medio completo RPMI y se cultivan en

placas de 24 pocillos (1 mL/pocillo) con o sin PHA 50  $\mu$ L (Cf = 25  $\mu$ g/mL). Añadimos los productos; control y blanco (DMSO al 0,5%), 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 25 - 5  $\mu$ M), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100 y 50  $\mu$ M) y el inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida (Cf = 30  $\mu$ M) y se incuba a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub> durante 3 h. Pasado este tiempo se adicionan 10  $\mu$ L de PHA (Cf =25  $\mu$ g/mL) incubando a 37 °C durante 24 h o 72 h. Se recogen las células y se centrifugan a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El pellet se fija con etanol 70% durante 30 min a -20 °C. Se centrifugan de nuevo las células a 2000 rpm durante 5 min y el pellet se resuspende en 450  $\mu$ L de PBS (pH 7,2), 30  $\mu$ L de ribonucleasa A (Cf = 100  $\mu$ g/mL) y 50  $\mu$ L de yoduro de propidio (Cf = 4  $\mu$ g/mL) incubando durante 1 h a 37 °C; de este modo se permite la tinción del ADN. Las muestras (10<sup>4</sup> células/muestra, por triplicado) se llevan al citómetro de flujo (EPICS XCL). El cálculo de los porcentajes de las fases celulares se realizó utilizando el programa informático del citómetro, Expo32 v1.2.

Tabla III.25. Protocolo para el ensayo del ciclo a distintas concentraciones

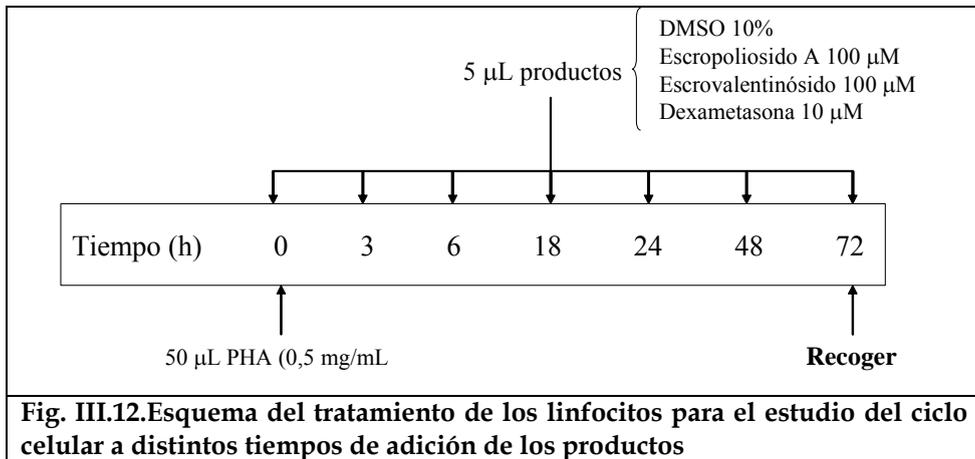
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Acción</b>
<b>0</b>	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
<b>3</b>	Sembrar células  Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL CHX (30 µM) 5 µL SC (100 µM, 50 µM) 5 µL SV (100 µM, 50 µM) 5 µL DMN (25, 10, 5 µM)
<b>6</b>	50 µL PHA (25 µg/mL) (excepto blanco)
<b>27 / 99</b>	Recoger células y centrifugar a 2000 rpm, T ambiente
<b>27:05/ 99:05</b>	Fijar en EtOH al 70% a -20 °C.  Se guardan las muestras de las 24 h a -20 °C.
<b>99:25</b>	Centrifugar todas las muestras a 2000 rpm, T ambiente
<b>99:30</b>	450 µL PBS + 30 µL ribonucleasa A + 50 µL yoduro de propidio
<b>99:30</b>	Analizar muestras por citometría de flujo



**Fig III.11. Histogramas del ciclo celular de linfocitos humanos. A) Las células estimuladas con PHA han entrado en fase de síntesis y mitosis. B) Gran parte de las células tratadas con PHA y cicloheximida han entrado en apoptosis, sin llegar a las fases de síntesis y mitosis.**

### B. Ensayo en función del tiempo

Las células se cultivan del mismo modo que en el apartado anterior. Se añaden 5  $\mu$ L de los productos: DMSO 0,5% al control, 5-O-desmetilnobiletina ( $C_f = 10 \mu$ M), escropoliósido A y escrovalentinósido ( $C_f = 100 \mu$ M) a las 0, 3, 6, 18, 24, 48 y 72 h después de haber estimulado las células con PHA ( $C_f = 25 \mu$ g/mL), dejándolas incubar a 37 °C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%. A las 72 h y 10 min se recogen las células y se sigue el protocolo descrito previamente para analizar las muestras mediante citometría de flujo y poder determinar la fase del ciclo celular que se encuentra afectada por los productos en estudio.



### III.5.12. Efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 e IL-10 en linfocitos humanos

Se ha seguido el método descrito por Kuo *et al.* (2003). Los linfocitos aislados se tratan con los productos, control y blanco (DMSO al 0,5%), 5-O-desmetilnobiletina ( $C_f = 10,0 - 0,3 \mu\text{M}$ ), escrovalentinósido y escropoliosido A ( $C_f = 100,00 - 6,25 \mu\text{M}$ ) y dexametasona ( $C_f = 10$  y  $1 \mu\text{M}$ ) por un espacio de 3 h. Pasado este tiempo las células se estimulan con  $10 \mu\text{L}$  de PHA ( $C_f = 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h o 72 h, en función de la citosina a medir. Con el fin de establecer qué efecto tienen los productos sobre la liberación basal de citocinas, se disponen un número de pocillos con células y productos a los que no se les adiciona el agente mitógeno. Todas las citocinas se miden a las 24 h, excepto TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  que se miden a las 72 h. Para ello las placas se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min reservando los sobrenadantes para valorar las distintas citocinas mediante inmunoensayo (ELISA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este ensayo se basa en una técnica de inmunoenzimática tipo sándwich. Se coloca el anticuerpo monoclonal específico para una citocina en los pocillos de una placa de microtitulación. El anticuerpo queda adsorbido en las paredes, sensibilizando la placa. Después se añade a cada pocillo la muestra que contiene el antígeno de prueba y si el antígeno reacciona con el anticuerpo, éste queda retenido. Posteriormente se añade un detector del anticuerpo que hará de unión entre el antígeno de la muestra y una peroxidasa, la avidina-HRP. Se añade la tetrametilbencidina (TMB), substrato de dicha enzima, que al oxidarse vira de incoloro a azul, de forma que la cuantificación se realizará por colorimetría midiendo en el espectrofotómetro a 450 nm.

**Tabla III.26. Protocolo para el ensayo de liberación de citocinas**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Acción</b>
0	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
3	Sembrar células Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL DXM 10 µM 5 µL SC 100-6,25 µM 5 µL SV 100-6,25 µM 5 µL DMN 10-0,3 µM
6	10 µL PHA (en los pocillos correspondientes)
27 / 99	Centrifugar placas 1200 rpm, 5 min Recoger sobrenadante y medir

### III.5.13. Efecto sobre la inducción de apoptosis

Con el fin de corroborar los datos obtenidos sobre el pico subG<sub>0</sub> en citometría de flujo, sobre todo con el flavonoide, se decidió hilar más fino investigando su posible efecto como inductor de la apoptosis. Aunque los iridoides demostraron claramente no tener este efecto, fueron incluidos para completar su estudio.

Este ensayo consta de dos apartados, en el primero se realiza el análisis de la fragmentación del ADN. Cuando una célula entra en apoptosis sufre ciertos cambios, entre ellos la escisión de su ADN, condensación y fragmentación del núcleo. Este ensayo permite visualizar la ruptura del ADN mediante electroforesis. La molécula de ADN está cargada negativamente y al ser expuesta en un gel de agarosa a una corriente eléctrica ésta corre y los fragmentos se separan por tamaño.

En el segundo ensayo se estudia el efecto apoptótico, descartando la necrosis mediante citometría de flujo. La anexina-FITC es un método usado para determinar cuantitativamente el porcentaje de células de una población que están en apoptosis. Dicha fase celular está caracterizada por ciertos cambios morfológicos como pérdida de la simetría de la membrana y su destrucción, condensación del citoplasma y núcleo, así como la ruptura del ADN. La pérdida de la membrana plasmática es uno de los primeros acontecimientos. En las células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidil serina (PS) pasa de la cara interna de la membrana plasmática a la externa, quedando así expuesto en la superficie celular. La anexina es una proteína que se une de forma Ca<sup>+2</sup>-

dependiente a los fosfolípidos de membrana y tiene gran afinidad por la PS, con lo cual es muy útil a la hora de identificar células apoptóticas.

El yoduro de propidio (PI) es una prueba estándar de citometría de flujo que distingue entre células viables y no viables. Las células viables con membranas intactas son impermeables al PI, mientras que las membranas de células dañadas o muertas sí son permeables.

#### **A. Análisis de la ruptura del ADN o *ladder***

##### *Tratamiento de los linfocitos con los productos*

Siguiendo el método de Yousefi *et al.* (1994) se suspenden  $1 \times 10^6$  linfocitos/mL en medio completo RPMI y se cultivan en placas de 24 pocillos (1 mL/pocillo). Las células se tratan con DMSO al 0,5% para control y blanco, 5-O-desmetilnobiletina (Cf = 25 - 5  $\mu$ M), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100 y 50  $\mu$ M) y cicloheximida (Cf = 30  $\mu$ M). Pasadas 3h de incubación se adicionan 50  $\mu$ L de PHA (Cf = 25  $\mu$ g/mL) a todos los pocillos, excepto al blanco y se deja incubar a 37 °C durante 24 h. Se recogen las células y se centrifugan a 2000 rpm durante 5 min.

##### *Aislamiento y purificación del ADN*

El pellet se resuspende en 450  $\mu$ L de tampón de lisis y se agita en el vortex. Al lisado se le añaden 50  $\mu$ L de SDS al 10% y se agita por inversión. Se añaden 1,5  $\mu$ L de proteinasa K (Cf = 100  $\mu$ g/mL) y se incubaba 45 min a 50 °C. Se añaden 200  $\mu$ L de NaCl 5M, se agita en el

vortex y se deja en hielo durante 15 min. Pasado este tiempo las muestras son centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min, se recoge el sobrenadante al que se le añaden 600  $\mu$ L (el mismo volumen que tenemos en el eppendorf) de la mezcla fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 : 24 : 1) y se agita. Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min y se recoge la fase acuosa, que es la que contiene el ADN. Se añaden 600  $\mu$ L de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1) y se agita en el vortex hasta que se forma una emulsión. Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min y se recoge la fase acuosa, a la que se le añade el mismo volumen de isopropanol que hay en el eppendorf, se agita por inversión y se añade 50  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (Cf = 10 mM) y 1  $\mu$ L de glucógeno (al 10% en  $H_2O$  ultrafiltrada p/v). Las muestras se dejan a  $-20$  °C durante toda la noche. Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C y se desecha el sobrenadante. El *pellet* se fija con 200  $\mu$ L de EtOH 70° a  $-20$  °C. Se agita por inversión y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se desecha el EtOH y se incuban los eppendorf a 37 °C durante 10 min para evaporar el resto de alcohol. Se resuspende el *pellet* en 25  $\mu$ L de tampón Tris-EDTA (TE) a 37 °C y se adiciona 2  $\mu$ L de RNAasa 0,5 mg/mL. Se deja 20 min a T ambiente.

**Tabla III.27. Protocolo para la extracción del ADN**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Acción</b>
<b>Día 1</b>	
0	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
3	Sembrar células  Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL CHX (30 µM) 5 µL SC (100 µM, 50 µM) 5 µL SV (100 µM, 50 µM) 5 µL DMN (25, 10, 5 µM)
6	50 µL PHA (25 µg/mL) (excepto blanco)
<b>Día 2</b>	
3	Recoger células y centrifugar a 2000 rpm, T ambiente  450 µL tampón de lisis. Agitar con vortex.  50 µL SDS 10%. Agitar por inversión.  1,5 µL proteinasa K. Agitar con vortex. Incubar a 50 °C
3:45	200 µL NaCl 5M. Agitar con vortex. Incubar en hielo.
4	Centrifugar 15 min , 12000 rpm, 0 °C
4:15	Recoger sobrenadante  1V sobrenadante + 1V fenol:cloroformo:isoamílico Agitar con vortex.  Centrifugar 5 min , 12000 rpm, 0 °C
4:20	Recoger la fase acuosa (apurar)

	<p>1V sobrenadante + 1V cloroformo:isoamílico</p> <p>Agitar con vortex (emulsión).</p> <p>Centrifugar 5 min , 12000 rpm, 0 °C</p>
<b>4:25</b>	<p>Recoger la fase acuosa (sin apurar)</p> <p>1V sobrenadante + 1V isopropanol</p> <p>Agitar por inversión.</p> <p>50 µL MgCl<sub>2</sub></p> <p>1 µL glucógeno (10%). Incubar a -20 °C toda la noche</p>
<b>Día 3</b>	
<b>0</b>	Centrifugar 10 min , 12000 rpm, 4 °C
<b>0:10</b>	<p>Fijar <i>pellet</i> con 200 µL EtOH 70° a -20 °C</p> <p>Centrifugar 10 min , 12000 rpm, 4 °C</p>
<b>0:20</b>	Incubar 10 min a 37 °C
<b>0:30</b>	<p>25 µL tampón TE</p> <p>2 µL RNAasa</p> <p>Incubar 20 min, T ambiente</p>

### *Cuantificación del ADN*

Una vez extraído el ADN se valora el rendimiento obtenido. Para ello se hace una dilución 1/100 de la muestra con agua ultrafiltrada (5 µL muestra + 495 µL de agua) y se mide la absorbancia a 260 y 280 nm en el fluorímetro, estableciendo la relación Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub>. La concentración de ADN se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs } 260 \times \epsilon_{\text{ADN}} \times 1/D$$

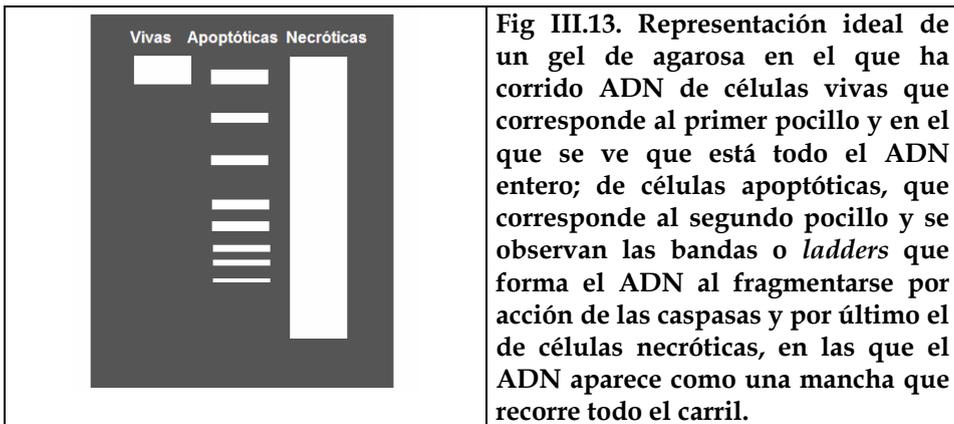
$\epsilon_{\text{ADN}}$ , 1 unidad de OD260 = 50  $\mu\text{g/mL}$  de ADN de doble cadena

D = dilución

### *Electroforesis*

En los pocillos se cargan 1  $\mu\text{g}$  de ADN disueltos en agua ultrafiltrada, que son previamente mezclados con 1  $\mu\text{L}$  de un tampón de carga de azul de bromofenol.

El gel de agarosa al 1,5% se elabora según se indica en la tabla III.10., se añaden 5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio, que se une al ADN y emite luz cuando es expuesto al UV. Una vez polimerizado el gel, se cargan las muestras y el patrón de pesos moleculares pUC18 DNA Dpn I digest y se hace correr a 60 mA (lo importante es que no pase de esta cantidad para que el gel no se caliente), 90 V constantes durante 40 min. Una vez han corrido las muestras se revela en un transluminador de luz UV.



## B. Ensayo de apoptosis Anexina V-FITC

Las células que tiñen positivo para Anexina-FITC y negativo para PI están entrando en apoptosis, es decir están en una fase temprana de apoptosis, y aquellas que tiñen positivo para ambos, Anexina-FITC y PI, están en la última fase de apoptosis, entrando en necrosis o están definitivamente muertas. Por tanto, las células que tiñen negativo tanto para Anexina-FITC como para PI, están vivas. El movimiento de las células a través de estos 3 estadios sugiere la existencia de apoptosis.

Los linfocitos se tratan siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior. Las células se recogen pasadas 24 h o 72 h. Seguidamente las células se centrifugan a 1500 rpm durante 5 min, se lavan 2 veces con PBS a -20 °C y se procede según las instrucciones del fabricante del kit empleado. Posteriormente las células se pasan por el citómetro de flujo ( $10^4$  células/muestra, por triplicado).

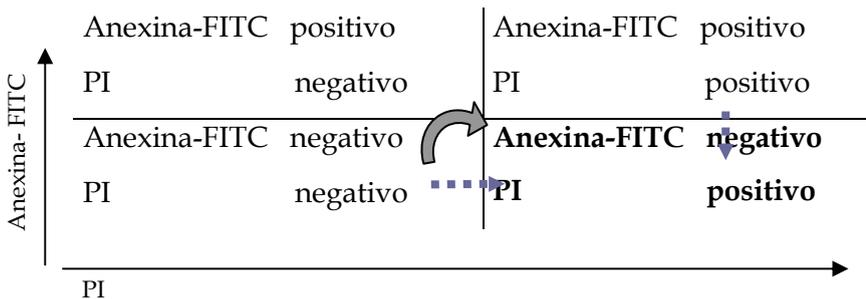
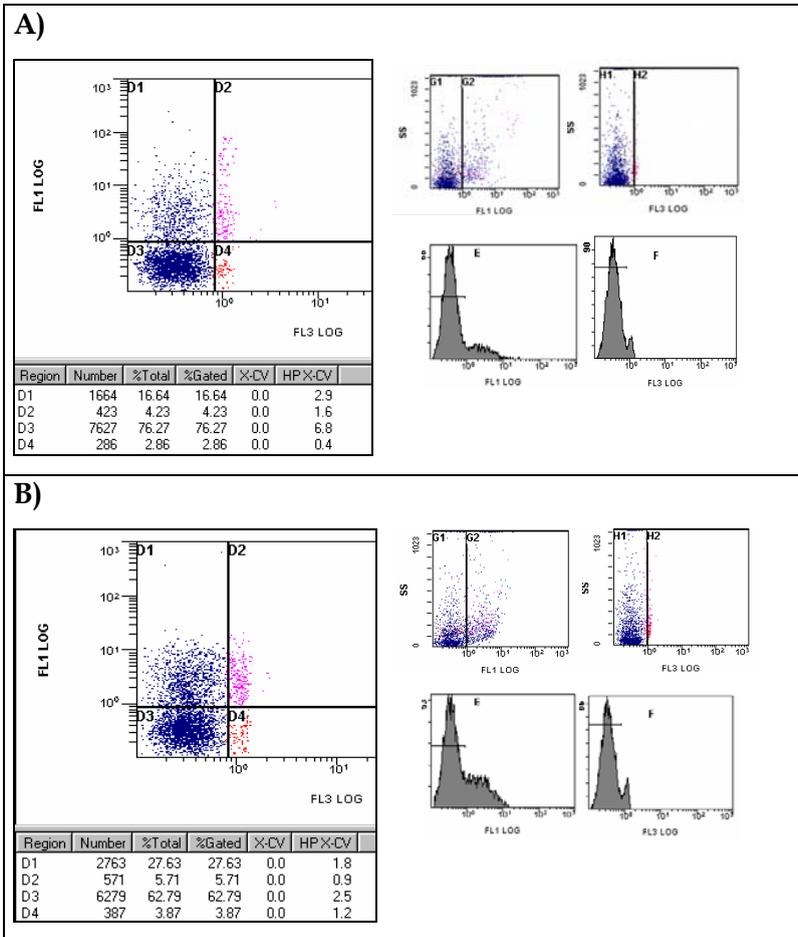


Fig III.14. Esquema del estadio de las células según la distribución de fluorescencia emitida. Las células del cuadrante izquierdo inferior están vivas, las del izquierdo superior están en apoptosis, las del derecho inferior son necróticas y en el cuadrante que queda están las células en transición, apoptóticas que acaban en necrosis.

**Tabla III.28. Protocolo para el ensayo de Anexina V- FITC**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Acción</b>
<b>0</b>	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
<b>24</b>	Sembrar células  Productos: 5 µL DMSO (al 0,5%) (controles) 5 µL CHX (30 µM) 5 µL SC (100 µM, 50 µM) 5 µL SV (100 µM, 50 µM) 5 µL DMN (25, 10, 5 µM)
<b>27</b>	50 µL PHA (en los pocillos correspondientes)
<b>96</b>	Recoger células y centrifugar a 1500 rpm, T ambiente
<b>96:05</b>	Teñir con Anexina- FITC y PI  Análisis por citometría de flujo



**Fig III.15. Histogramas del estadio celular de linfocitos humanos. A) Las células estimuladas con PHA están vivas, sin embargo en estrés producido por el mitógeno hace que algunas de ellas entren en fase de apoptosis. B) Gran parte de las células tratadas con PHA y cicloheximida han entrado en apoptosis, no se modifica el número de células necróticas respecto al control.**

### C. Efecto sobre la actividad caspasa-3

La familia de las caspasas ocupa posiciones estratégicas en las cascadas de transducción de señal asociada con respuestas inmunes. En muchas ocasiones la activación de las caspasas culmina en apoptosis celular. Sin embargo, las caspasas también juegan papeles de vital importancia en las reacciones inmunitarias, que culminan en la producción de citocinas en lugar de en apoptosis. Por ejemplo, es bien conocido que la caspasa-1 (o IL-1 $\beta$  enzima convertidora, ICE) es esencial en la producción de IL-1 $\beta$  y IL-18 [Creagh *et al.*, 2003; Krakauer, 2004].

La caspasa-3, por su parte es el punto de convergencia entre la vía apoptótica extrínseca iniciada a través de los receptores de muerte (Fas-FasL), el TNF- $\alpha$  y su receptor TNF-R1, así como la IL-1 con IL-R1; y la vía intrínseca iniciada a través de la mitocondria [Sabbagh *et al.*, 2004]. Pese a todo, la caspasa-3 es activa en linfocitos T estimulados por un agente mitógeno como el PHA o por anti-CD3 y lo que es más importante, en ausencia de apoptosis y es imprescindible para que las células T entren en el ciclo celular y proliferen [Falk *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 1999; Lakhani *et al.*, 2003; Schwerk *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004]. La inhibición de la activación de la caspasa-3 conlleva una deficiente proliferación celular en linfocitos T que son estimulados a través del TCR, aunque las reacciones iniciales en la activación de las células T sean adecuadas [Sabbagh *et al.*, 2004].

Con el fin de estudiar una posible vía relacionada con el efecto inhibitorio de los productos en estudio sobre la proliferación linfocitaria,

se lleva a cabo el ensayo de la inhibición de la actividad caspasa en dichas células.

Una vez aislados los linfocitos humanos, se trataron con los productos, 5-*O*-desmetilnobiletina (Cf = 25-5  $\mu$ M), escrovalentinósido y escropoliósido A (Cf = 100  $\mu$ M), cicloheximida (Cf = 10  $\mu$ M) y un inhibidor específico de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO (Cf = 10  $\mu$ M) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO<sub>2</sub>. Pasadas 3h de incubación se adicionan, o no, 10  $\mu$ L de PHA (Cf = 25  $\mu$ g/mL) incubando a 37 °C durante 24 h.

Por último, se toman las células y se determina la actividad caspasa-3 empleando un kit que tiene como ventaja la posibilidad de medir la actividad caspasa-3 directamente en la célula, sin necesidad de realizar la extracción previa de la enzima. El Ac-DEVD-AMC es un indicador fluorogénico de la actividad enzimática. La caspasa-3 actúa sobre el sustrato Ac-DEVD-AMC liberando al fluoróforo AMC que emite una fluorescencia azul detectada mediante un fluorímetro a Ex/Em= 354/442 nm.

**Tabla III.29. Protocolo para el ensayo de actividad caspasa-3**

Tiempo (h)	Acción
0	Aislar células, incubar a 37 °C 5% CO <sub>2</sub>
24	Sembrar células Productos: 5 µL DMSO al 0,5% (controles) 5 µL CHX 10 µM 5 µL Ac-DEVD-CHO 10 µM 5 µL SC 100 µM 5 µL SV 100 µM 5 µL DMN 25, 10, 5 µM
27	50 µL PHA (en los pocillos correspondientes)
48	Medir actividad caspasa-3

### III.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media de los valores  $\pm$  SEM (error estándar de las medias,  $SD/\sqrt{n}$ ) o bien la media de los valores  $\pm$  SD, dependiendo del experimento. La desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, se han determinado usando el ensayo de varianza ANOVA seguido del test de la t de Bonferroni o la t de Dunnett, según corresponda, para comparaciones múltiples. Los valores de  $P < 0,05$  (\*) se consideran significativos y los valores  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,001$  (\*\*\*, sólo Bonferroni) se consideran muy significativos.

Los porcentajes de inhibición (%) se calculan a partir de las diferencias entre el grupo control y problema, expresando el valor respecto al grupo control

$$\%I = \frac{\text{Control} - \text{Problema}}{\text{Control}} \times 100$$

El cálculo de las concentraciones inhibitorias-50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos se realiza mediante regresiones lineales de las gráficas concentración/respuesta con el 95% de confianza, obtenida al menos de cuatro concentraciones diferentes.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Actividad antiinflamatoria *in vivo* y *ex vivo*

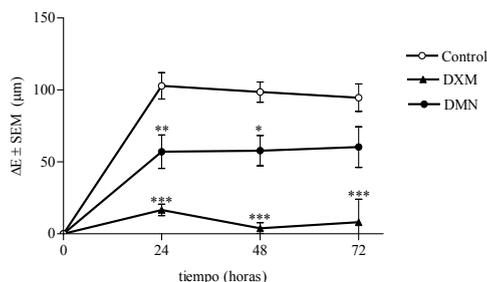
#### IV.1.1. Hipersensibilidad por contacto inducida por DNFB

- **Medida del edema**

La aplicación de 5-O-desmetilnobiletina (DMN, 0,5 mg/oreja) inhibió tanto la fase de inducción (24 h) como la reacción inflamatoria (48 y 72 h) en ratón previamente sensibilizado con DNFB. La reacción de hipersensibilidad se redujo un 47% a las 24 h, 40% a las 48 h y 38% a las 72 h (Tabla IV.1). Sin embargo, escropoliósido A (SC) y escrovalentinósido (SV) a 0,5 mg/oreja no mostraron actividad (Tabla IV.2).

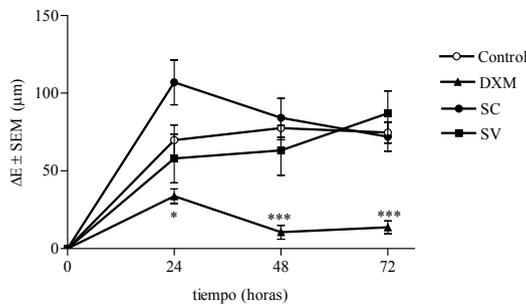
**Tabla IV.1.** Efecto de DMN sobre el edema en oreja de ratón inducido por aplicación tópica de DNFB. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni);  $n = 6$  animales.

horas	Control		DXM (0,025 mg/oreja)		DMN (0,5 mg/oreja)	
	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I
24	102,8 $\pm$ 30,1	-	16,6 $\pm$ 10,2 ***	84	57,1 $\pm$ 40,2 **	44
48	98,5 $\pm$ 19,8	-	3,8 $\pm$ 9,9 ***	96	57,8 $\pm$ 33,2 *	41
72	94,6 $\pm$ 23,4	-	8,0 $\pm$ 32,2 ***	91	60,3 $\pm$ 34,5	36



**Tabla IV.2.** Efecto de SC y SV sobre el edema en oreja de ratón inducido por aplicación tópica de DNFB. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 6 animales.

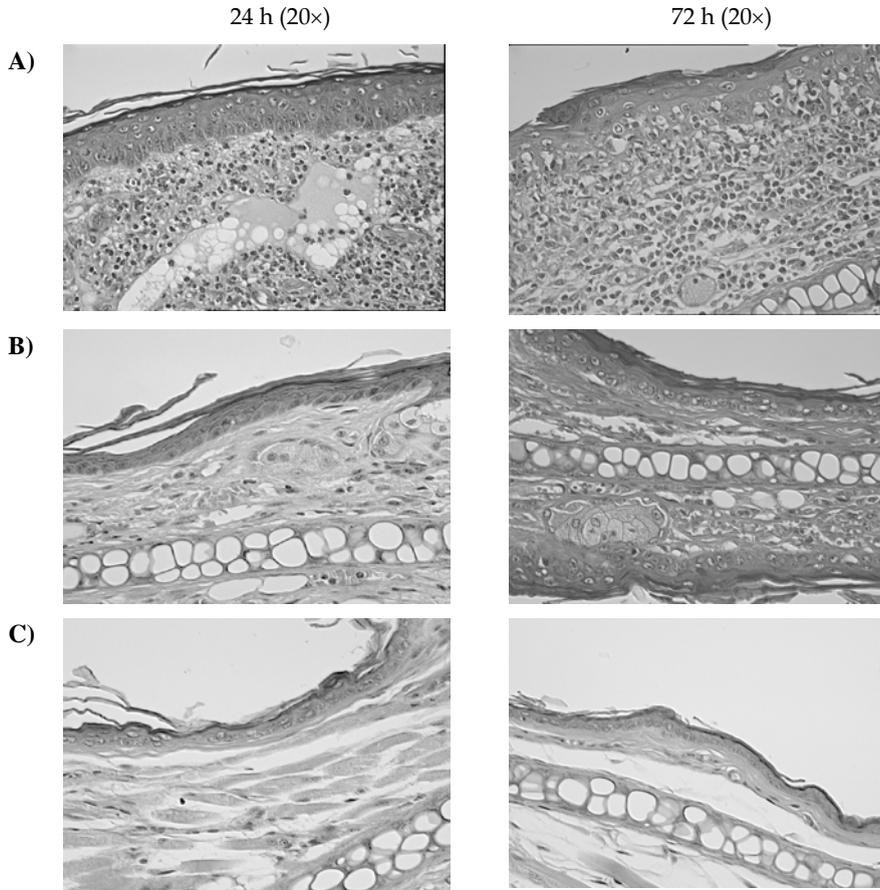
horas	Control		DXM (0,025 mg/oreja)		SC (0,5 mg/oreja)		SV (0,5 mg/oreja)	
	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I
24	70 $\pm$ 29	-	34 $\pm$ 13*	52	107 $\pm$ 43	-53	58 $\pm$ 43	17
48	77 $\pm$ 21	-	11 $\pm$ 14***	86	84 $\pm$ 37	-9	63 $\pm$ 36	18
72	75 $\pm$ 21	-	14 $\pm$ 13***	82	72 $\pm$ 28	4	87 $\pm$ 35	-16



▪ **Estudio histológico**

La aplicación de DNFB a la oreja del ratón previamente sensibilizado produce una lesión inflamatoria que afecta la dermis, con edema e infiltración celular (neutrófilos : linfocitos : macrófagos en relación 2:2:1) que evoluciona a fibrosis papilar. La epidermis presenta papilomatosis, acantosis y excitosis (Fig. IV.1A). Las orejas de los ratones tratados con DMN (Fig. IV.1B) y dexamentasona (Fig. IV.1C) presentan cambios histológicos respecto al grupo control, destacando la lesión inflamatoria mínima, reducción de edema, espesor de epitelio e infiltración celular (solo neutrófilos). Otros parámetros inflamatorios como papilomatosis y acantosis también se presentan reducidos en los grupos problemas respecto al grupo control.

Ninguno de los iridoides tuvo actividad en este test, por lo que no se han estudiados las muestras correspondientes.



**Fig. IV.1.** Secciones de orejas de los grupos control (A), DMN (B) y dexametasona (C) teñidas con hematoxilina-eosina.

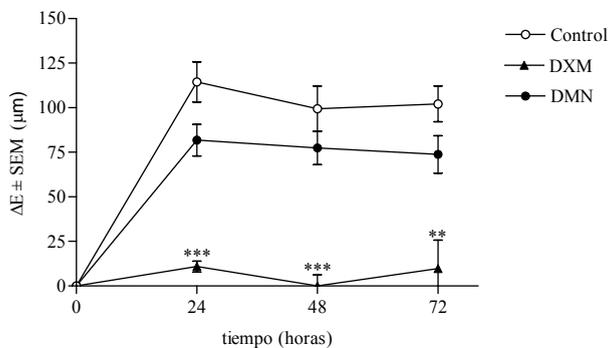
### IV.1.2. Hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona

#### ▪ Medida del edema

La aplicación de DMN (0,5 mg/oreja) redujo significativamente la reacción de hipersensibilidad por contacto inducida por oxazolona en un 29% a las 24 h, 23% a las 48 h y 28% a las 72 h (Tabla IV.3). La aplicación de SC (0,5 mg/oreja) no afectó la fase de inducción (24 h), pero sí fue activo a las 48 h (30% de inhibición del edema) que se hizo más patente a las 72 h reduciendo el edema un 79% (Tabla IV.4). El iridoide SV, al igual que el SC, no tuvo efecto durante las primeras 24 h aunque a las 48 h redujo la inflamación un 41% y a las 72 h un 57% (Tabla IV.4).

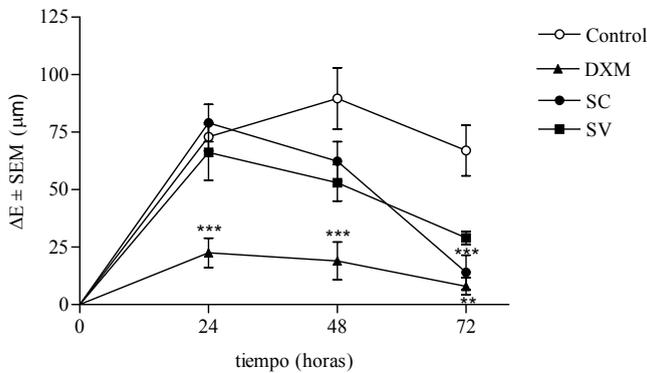
**Tabla IV.3.** Efecto de DMN sobre el edema en oreja de ratón inducido por aplicación tópica de OXZ. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni);  $n = 6$  animales.

horas	Control		DXM (0,025 mg/oreja)		DMN (0,5 mg/oreja)	
	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I
24	$114,4 \pm 39,0$	-	$10,9 \pm 8,6$ ***	90	$81,9 \pm 19,9$	29
48	$99,4 \pm 39,9$	-	$0,0 \pm 14,2$ ***	98	$77,4 \pm 26,5$	23
72	$102,1 \pm 21,0$	-	$9,8 \pm 22,4$ **	90	$73,8 \pm 25,8$	28



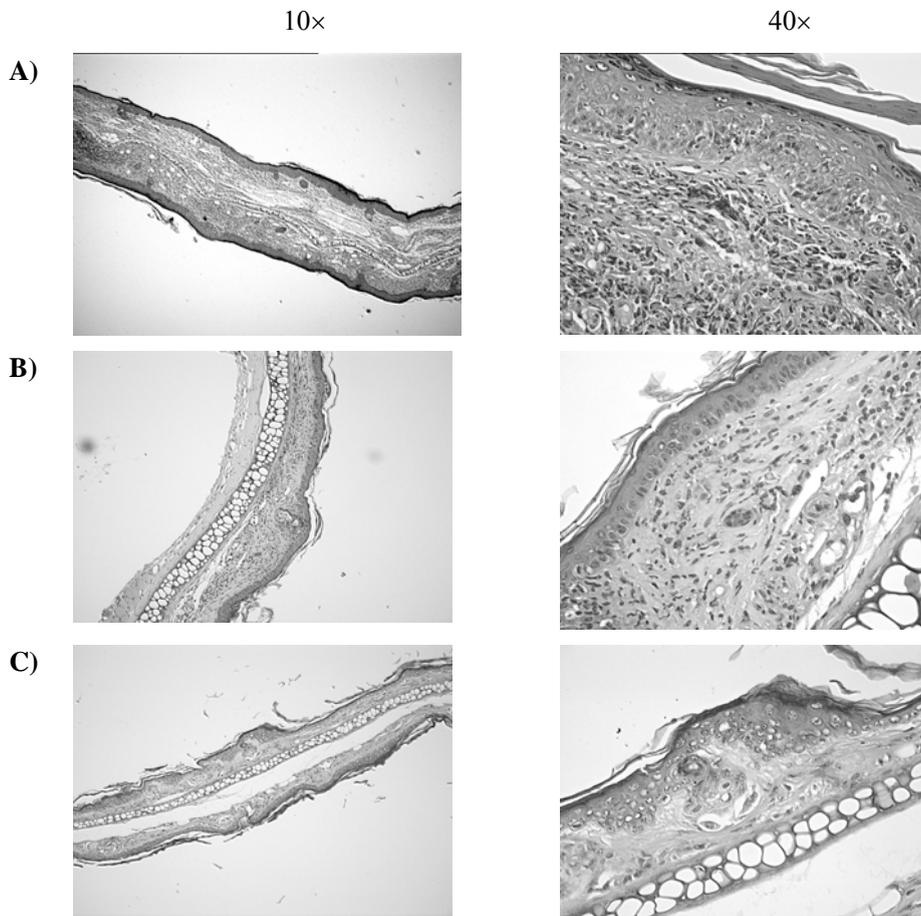
**Tabla IV.4.** Efecto de SC y SV sobre el edema en oreja de ratón inducido por aplicación tópica de OXZ. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (Test de Bonferroni);  $n = 6$  animales.

	Control		DXM (0,025 mg/oreja)		SC (0,5 mg/oreja)		SV (0,5 mg/oreja)	
h	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I
24	73,0 $\pm$ 23,0	-	22,50 $\pm$ 23,8 ***	69	79,0 $\pm$ 28,0	-8	66,2 $\pm$ 45,7	10
48	89,6 $\pm$ 37,7	-	19,0 $\pm$ 16,5 ***	79	62,3 $\pm$ 32,2	30	53,0 $\pm$ 21,0	41
72	67,0 $\pm$ 31,0	-	8,0 $\pm$ 8,2 **	88	14,0 $\pm$ 27,0 ***	79	29,0 $\pm$ 7,0	57



#### ▪ Estudio histológico

Las orejas tratadas con oxazolona (grupo control) presentan una lesión característica con edema e infiltración celular difusa (neutrófilos : linfocitos, relación 1:1, y ausencia de macrófagos en la dermis). La epidermis presenta acantosis sin espongiosis y exocitosis, y también un grado intermedio de hipertrofia e hiperplasia de fibroblastos y fibrosis subpapilar (Fig. IV.2A). Las orejas tratadas con DMN presentan cambios histológicos con respecto al grupo control, incluyendo reducción de edema, infiltración focal con reducción de linfocitos pero sin afectar a los neutrófilos, y supresión de papilomatosis y acantosis (Fig. IV.2B). El grupo tratado con dexametasona no presenta edema o infiltración, aunque presenta una ligera papilomatosis y acantosis (Fig. IV.2C)



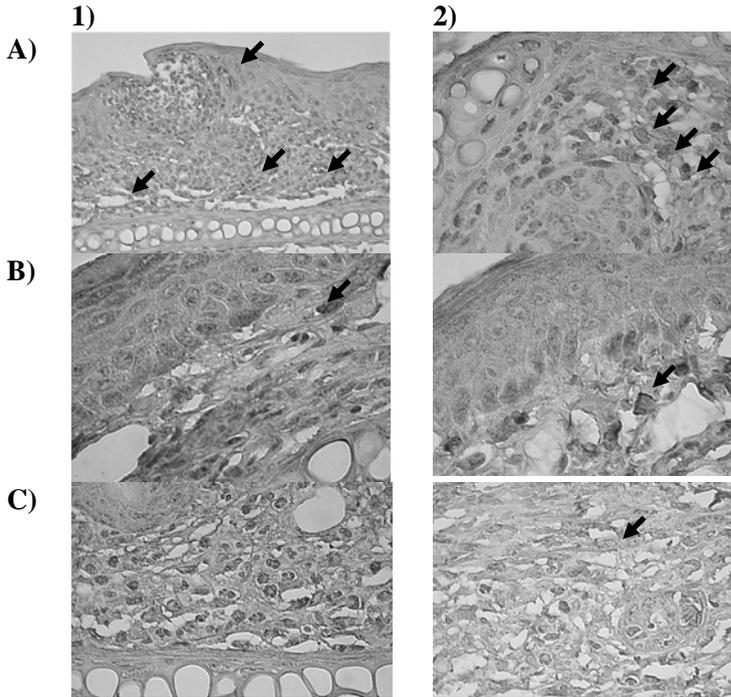
---

**Fig. IV.2.** Secciones de orejas de los grupos control (A), DMN (B) y dexametasona (C) teñidas con hematoxilina-eosina.

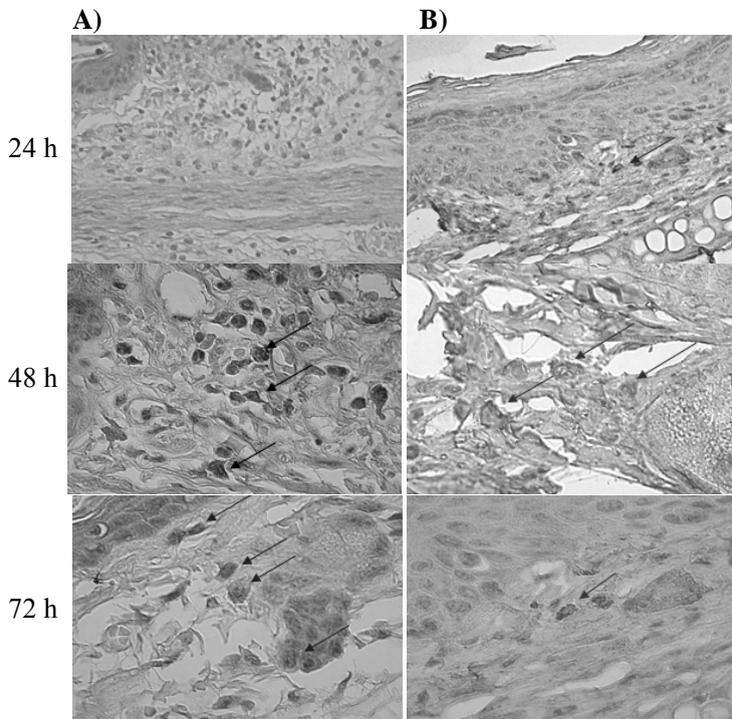
---

El estudio inmunohistoquímico de las orejas del grupo control de la reacción de hipersensibilidad inducida por ozaxolona presenta una clara inducción de COX-2 en el citoplasma de células mononucleares (Fig. IV.3A), con una clara reducción de la expresión en las orejas procedentes del grupo tratado con DMN (Fig. IV.3B) cuando se compara con el grupo control. En el grupo tratado con dexametasona la inducción es mínima

(Fig. IV.3C). El estudio inmunohistoquímico de las orejas tratadas con DMN presenta un claro predominio de los linfocitos CD4<sup>+</sup> (Fig. IV.4A) sobre los CD8<sup>+</sup> (Fig. IV.4B)



**Fig. IV.3.** Estudio inmunohistoquímico (COX-2) de las orejas de ratón de la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona. Secciones de orejas de los grupos control (A), DMN (B) y dexametasona (C) teñidas con hematoxilina-eosina. A1 a 20×; B1, C1, A2, B2 y C2 a 40×. Las células con presencia citoplasmática de COX-2 se marcan con flecha.



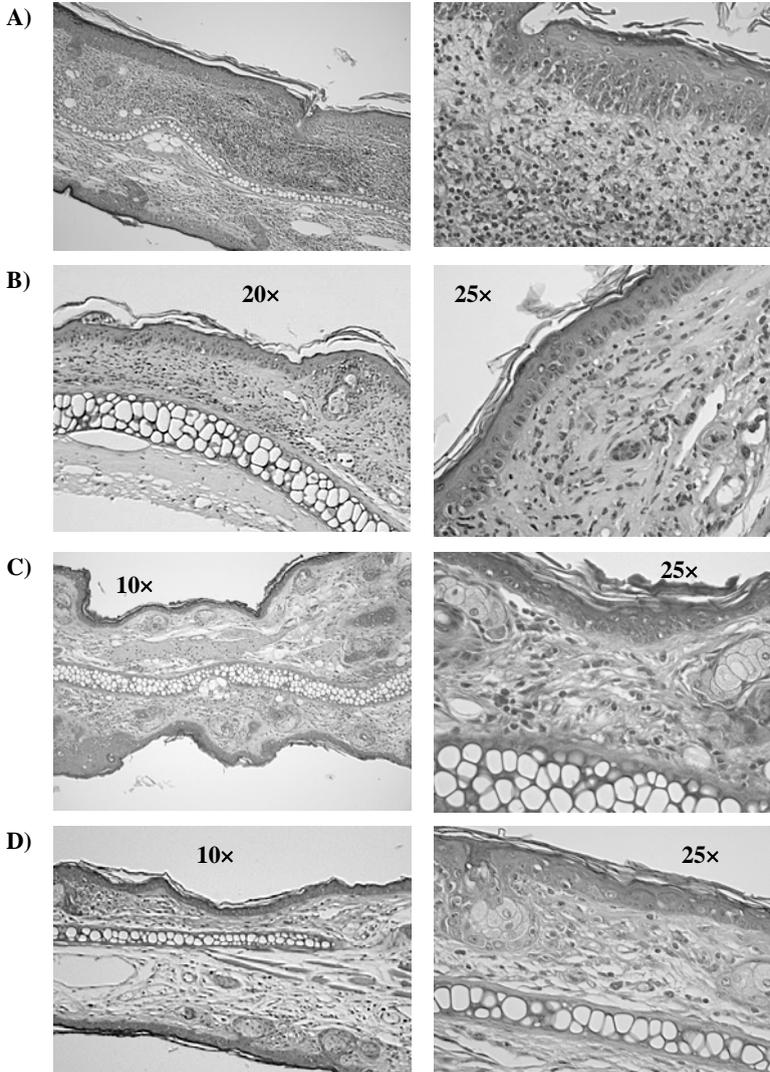
---

**Fig. IV.4.** Estudio inmunohistoquímico de las orejas de ratón de la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona (40×). Presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tras la sensibilización con oxazolona y posterior tratamiento con DMN a las 24, 48 y 72 h. La presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) positivos esta marcada con una flecha.

---

Respecto a los iridoides, el grupo tratado con oxazolona (control) presenta similares características al anterior, pero mayor infiltración leucocitaria (neutrófilos–linfocitos–macrófagos, 3:2:1) y signos de papilomatosis, acantosis, espongiosis y exocitosis (Fig. IV.5A). Las orejas de los grupos problemas (SC y SV) presentan reducción de edema e infiltración de linfocitos y macrófagos, con ausencia de linfocitos. Hay ausencia de papilomatosis, acantosis, espongiosis y exocitosis (Fig. IV.5B y IV.5C). Los grupos tratados con dexametasona no presentan lesiones

inflamatorias ni infiltración celular, además hay una drástica reducción del edema (Fig. IV.5D).



**Fig. IV.5.** Secciones de orejas de los grupos control (A), SC (B), SV (C) y dexametasona (D) teñidas con hematoxilina-eosina.

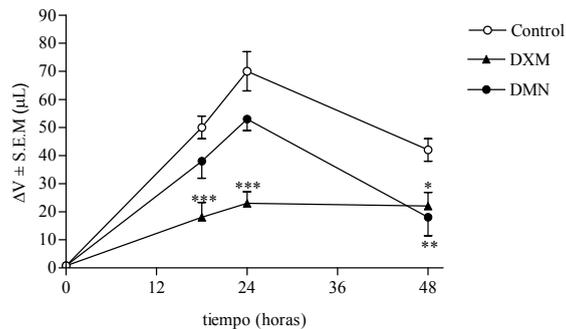
### IV.1.3. Hipersensibilidad retardada inducida por eritrocitos de cordero (SRBC)

▪ **Medida del edema**

La administración de DMN (15 mg/kg, i.p.) redujo la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC en pata de ratón en un 57% a las 48 h, pero no modificó la reacción a las 18 ni 24 h.

**Tabla IV.5.** Efecto de DMN sobre el edema en pata de ratón inducido por inyección subcutánea de SRBC. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 6 animales.

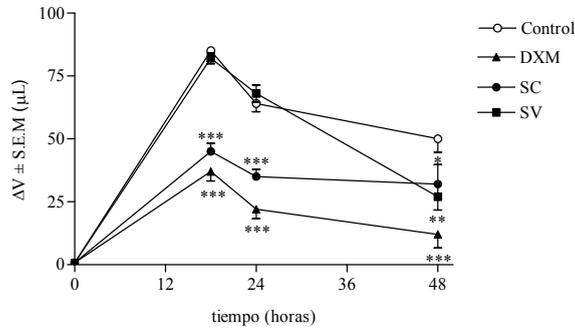
horas	Control		DXM (10 mg/kg)		DMN (15 mg/kg)	
	$\Delta$ Volumen	%I	$\Delta$ Volumen	%I	$\Delta$ Volumen	%I
18	50,0 $\pm$ 8,0	-	18,0 $\pm$ 13 ***	64	38,0 $\pm$ 15	24
24	70,0 $\pm$ 14	-	23,0 $\pm$ 16,5 ***	67	53,0 $\pm$ 21,0	24
48	42,0 $\pm$ 9,8	-	22,0 $\pm$ 12,0 *	48	18,0 $\pm$ 16,0 **	57



El SC redujo de forma significativa el edema a las 24 h un 47%, que se mantuvo a las 48 h con un 45% y finalmente bajo a las 72 h con un 36% de inhibición. Sin embargo, el SV no inhibió la inflamación durante las primeras 48 h y se mostró efectivo a las 72 h con una inhibición significativa del 46%.

**Tabla IV.6.** Efecto de SC y SV sobre el edema en pata de ratón inducido por inyección subcutánea de SRBC. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (Test de Bonferroni);  $n = 6$  animales.

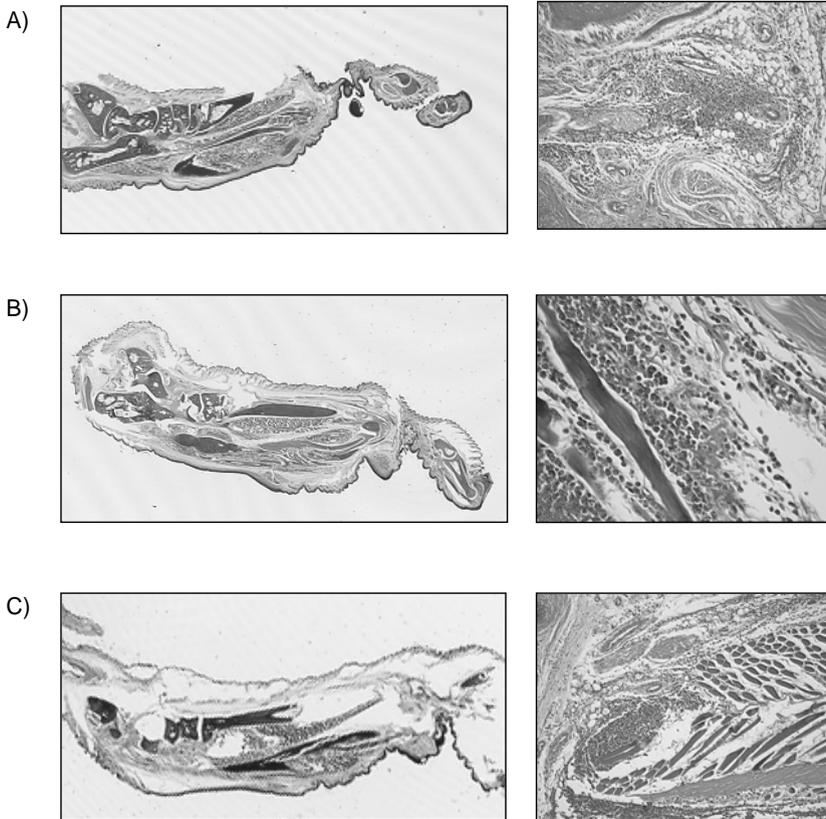
Horas	Control		DXM (10 mg/kg)		SC (15 mg/kg)		SV (15 mg/kg)	
	$\Delta$ Volumen	%I	$\Delta$ Volumen	%I	$\Delta$ Volumen	%I	$\Delta$ Volumen	%I
18	85,0 $\pm$ 12,0	-	37,0 $\pm$ 9,0 ***	56	45,0 $\pm$ 8,0 ***	47	82,0 $\pm$ 8,0	4
24	64,0 $\pm$ 9,0	-	22,0 $\pm$ 9,0 ***	66	35,0 $\pm$ 7,0 ***	45	68,0 $\pm$ 9,0	-6
48	50,0 $\pm$ 15,0	-	12,0 $\pm$ 13,0 ***	76	32,0 $\pm$ 19,0 *	36	27,0 $\pm$ 13,0 **	46



#### ▪ Estudio histológico

El estudio histológico de las patas del grupo control presenta signos característicos de inflamación, con infiltración focal (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) y edema marcado. La lesión afecta principalmente al tejido conectivo en dermis, tejido muscular, fascia y tendones. También resalta una mínima inflamación articular con pannus (<20%) y quistes aislados con fibrina. El efecto sobre el cartílago y hueso es mínimo con menos del 5% de la superficie de los huesos (osteoclastos) afectada (Fig. IV.6A). Los ratones tratados con DMN presentan similares síntomas pero sin quistes ni osteoclastos, y la lesión inflamatoria está atenuada y focalizada en el tejido conectivo (Fig. IV.6B). Los animales

tratados con dexametasona presentan similar perfil inflamatorio que los tratados con el flavonoide (Fig. IV.6C)



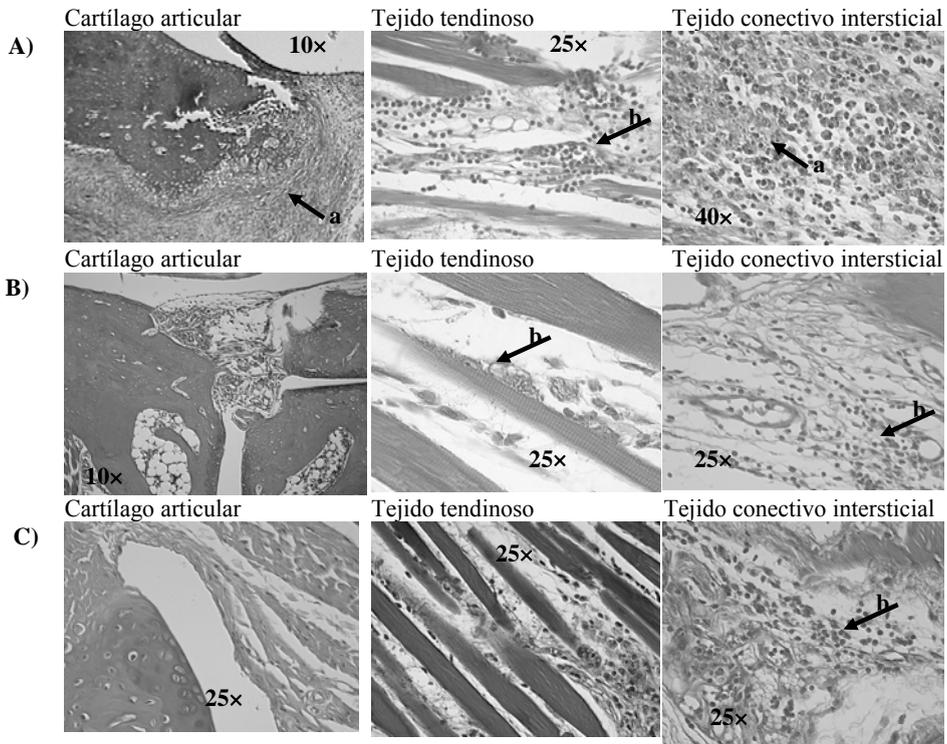
---

**Fig. IV.6.** Secciones de patas teñidas con hematoxilina-eosina de los grupos control (A), DMN (B) y dexametasona (C) tras la sensibilización con SRBC.

---

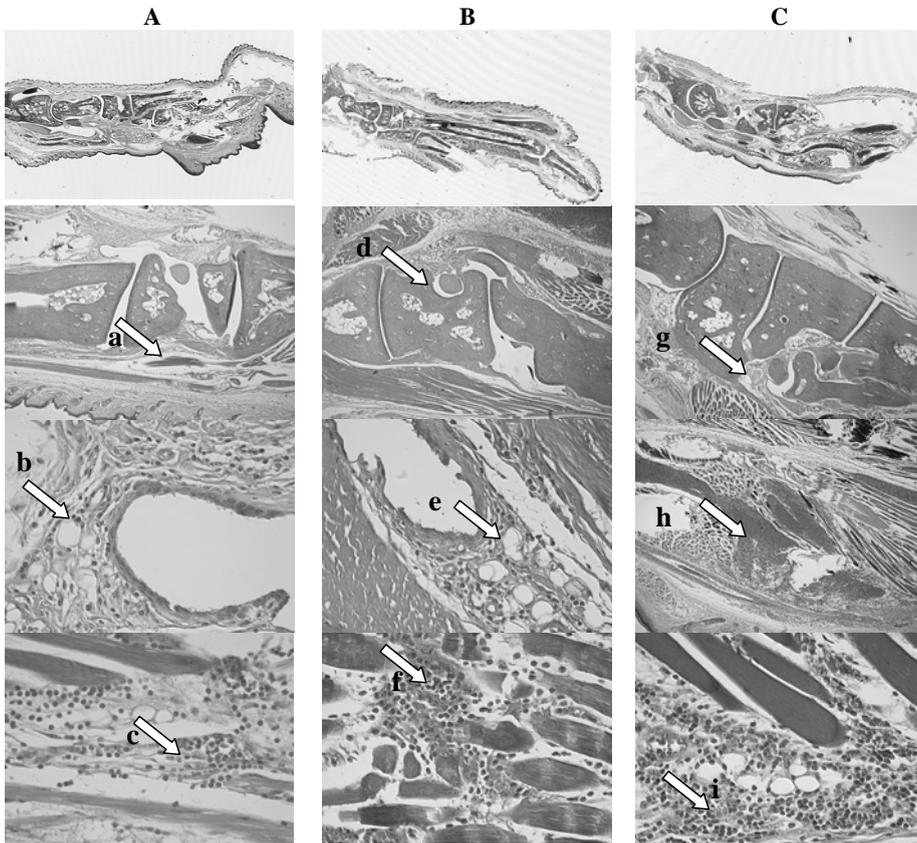
Las secciones de patas del grupo control teñidas con hematoxilina-eosina presentan lesiones inflamatorias focales con edema afectando al tejido conectivo, junto a necrosis e infiltración leucocitaria con predominio de leucocitos polimorfonucleares a nivel de la membrana sinovial, tejido conectivo, tendón y a nivel perivascular (Fig. IV.7A). Las

patas correspondientes a ratones tratados con SC presentan una lesión inflamatoria media, con fibrosis e infiltración de polimorfonucleares y linfocitos. En el tejido conectivo de las vainas tendinosas y el músculo esquelético aparece infiltrado intersticial de macrófagos y polimorfonucleares, mientras en el tejido articular, existe fibrosis y escaso infiltrado inflamatorio (Fig. IV.7B). El grupo tratado con dexametasona presenta fibrosis sin filtrado inflamatorio en el tejido articular. Sin embargo, se observa infiltración en el tejido conectivo de fascias y en las vainas tendinosas, junto a una ligera lesión inflamatoria y necrosis focal (Fig. IV.7C).



**Fig. IV.7.** Secciones de patas de los grupos control (A), SC (B) y dexametasona (C) teñidas con hematoxilina-eosina del estudio de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC. **A)** Control: Inflamación aguda con actividad severa; necrosis y predominio de polimorfonucleares (columnas 1 y 2); infiltrado intersticial en tejido conectivo de fascias y vainas tendinosas (columna 3). **B)** SC: lesión inflamatoria con actividad moderada o media (1); fibrosis y mezcla escasa de polimorfonucleares y linfocitos (columnas 1 y 2); infiltrado intersticial de polimorfonucleares y macrófagos en tejido conectivo de vainas tendinosas y músculo esquelético (columna 3); fibrosis y escaso infiltrado en tejido articular (columnas 1 y 2). **C)** Dexametasona: Fibrosis sin infiltrado inflamatorio en tejido articular (columna 1); infiltrado en tejido conectivo de fascias y vainas tendinosas (columna 2); lesión inflamatoria con actividad media o moderada y necrosis focal (columna 3). **a** = necrosis; **b** = infiltrado inflamatorio.

En el estudio histológico de las patas del grupo control se observa una característica lesión inflamatoria de intensidad media con edema moderado afectando al tejido conectivo. Hay también edema, congestión e infiltración celular a nivel de la membrana sinovial (sinovitis), así como a nivel del tejido conectivo de la fascia del músculo y endomiositis (miositis), y en el tendón (tendinitis) y zonas perivasculares. Las células infiltrantes son predominantemente polimorfonucleares (Fig. IV.8A). En contraste, las patas de los ratones tratados con SV presentan cambios histológicos con respecto a las patas del grupo control, con mínimo edema focal e inflamación y erosión media del cartílago (Fig. IV.8B). Los datos histológicos de las patas del grupo tratado con dexametasona son similares a los del grupo SV, pero el proceso inflamatorio está claramente reducido (Fig. IV.8C).



**Fig. IV.8.** Secciones de patas de los grupos control (A), SV (B) y dexametasona (C) teñidas con hematoxilina-eosina del estudio de hipersensibilidad retardada inducida por SRBC. **a,d,g)** imágenes generales con infiltración en tejido conjuntivo; **b,e)** sinovitis; **h)** infiltrado inflamatorio en tejido conectivo y fascia del músculo; **c,i)** células mononucleares en tejido conectivo de fascia; **i)** infiltrado inflamatorio de células mononucleares; **f)** tendinitis.

#### IV.1.4. Inflamación crónica inducida por aplicación repetida de TPA

##### ▪ Medida del edema

La aplicación repetida de TPA en la oreja de ratón provoca un proceso inflamatorio subcrónico. La administración tópica de 5-O-desmetilnobiletina (0,25 mg/oreja) redujo significativamente el edema un 47% (Tabla IV.7).

**Tabla IV.7.** Efecto de los productos sobre el edema producido por inflamación crónica en oreja de ratón inducido por aplicación múltiple de TPA. DMN (0,25 mg/oreja), DXM (0,025 mg/oreja). \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$  (T de Dunnett);  $n = 6$  animales

Control	DXM (0,025 mg/oreja)		DMN (0,25 mg/oreja)		Acetona
Peso	Peso		Peso		Peso
26,1 ± 1,2	14,2 ± 0,4**		19,0 ± 1,1**		11,1 ± 0,1**
ΔPeso	%I	ΔPeso	%I	ΔPeso	%I
15,0	-	3,0	80	8,0	47

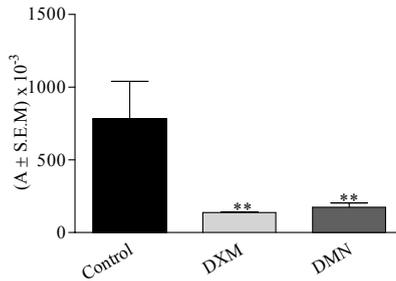
Group	ΔP (mg)
Control	15.0
DXM	3.0
DMN	8.0

#### IV.1.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

Tanto el flavonoide como dexametasona inhibieron la infiltración leucocitaria en un 78% y 82%, respectivamente, medida indirectamente como actividad MPO en los tejidos.

**Tabla IV.8.** Efecto de los productos la infiltración leucocitaria medida como la actividad MPO. DMN (0,25 mg/oreja), DXM (0,025 mg/oreja). \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 6 animales

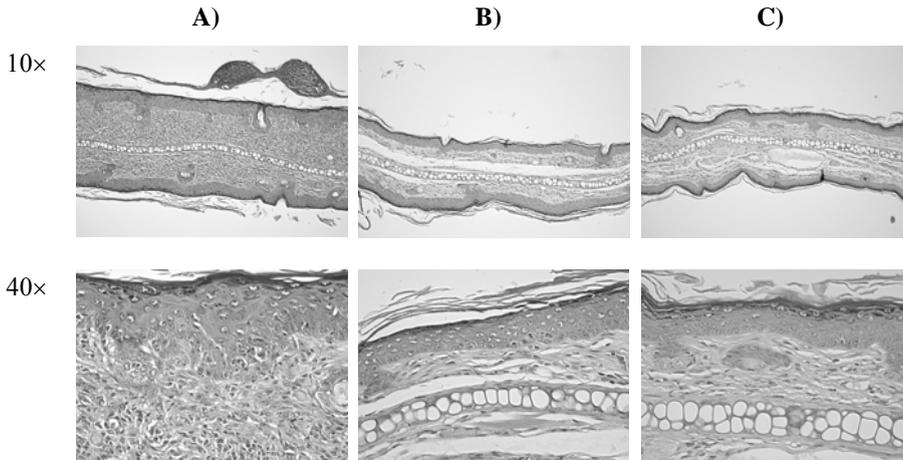
Control		DXM (0,025 mg/oreja)		DMN (0,25 mg/oreja)	
$A \times 10^{-3}$	%I	$A \times 10^{-3}$	%I	$A \times 10^{-3}$	%I
781 ± 260	-	138 ± 4**	82	174 ± 30**	78



▪ **Estudio histológico**

El estudio histológico de las muestras tratadas solo con TPA presentan inflamación difusa en la dermis caracterizada por formación de edema y presencia de un infiltrado con predominio de neutrófilos, linfocitos y macrófagos (3:2:1) junto a hipertrofia, hiperplasia y fibrosis papilar. En la epidermis se observa papilomatosis, acantosis e hiperqueratosis, junto a espongirosis y exocitosis de linfocitos, así como incremento en el grosor del epitelio (Fig. IV.9A). El tratamiento con DMN reduce el edema y la infiltración celular focal, pasando ésta a una relación (1:1:0), junto a la reducción del grosor del epitelio. Los otros parámetros inflamatorios, como papilomatosis, hiperqueratosis y espongirosis están también atenuados en el caso de los ratones tratados con DMN (Fig. IV.9B). En contraste, el grupo tratado con dexametasona no presenta lesión con edema, solo un infiltrado difuso en la dermis con

predominio de linfocitos y algunos macrófagos. La hipertrofia, hiperplasia y fibrosis papilar están muy reducidas o han desaparecido. El grosor del epitelio, papilomatosis e hiperqueratosis son inferiores al grupo control (Fig. IV.9C)



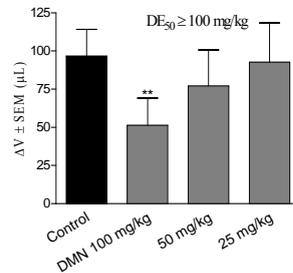
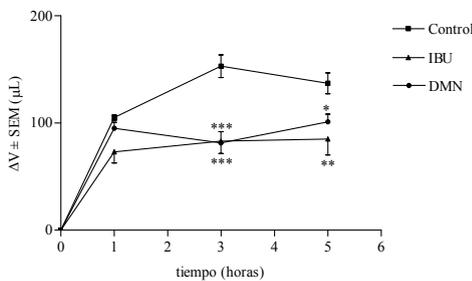
**Fig. IV.9.** Secciones de orejas teñidas con hematoxilina-eosina tras la aplicación de TPA de los grupos control (A), DMN (B) y dexametasona (C)

### IV.1.6. Edema inducido por carragenina en pata de ratón

La administración oral de la flavona (100 mg/kg) redujo significativamente el edema un 47% a las 3 h, mientras que no tuvo un efecto significativo a la hora y a las 5 horas después de la administración de carragenina. La reducción de la dosis administrada conllevó un descenso en el efecto farmacológico, siendo del 4% de inhibición a 25 mg/kg y del 20% a 50 mg/kg.

**Tabla IV.9.** Efecto de los productos sobre el edema inducido por inyección subcutánea de carragenina en pata de ratón. A) DMN (100 mg/kg), IBU (60 mg/kg) a 1 h, 3 h y 5 h. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni);  $n = 6$  animales. B) Efecto de DMN a las 3 h después de la inyección de carragenina. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett);  $n = 6$  animales

Horas	Control		IBU (60 mg/kg)		DMN (100 mg/kg)	
	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I	$\Delta$ Espesor	%I
1	105 $\pm$ 7	-	73 $\pm$ 25	30	95 $\pm$ 16	9
3	153 $\pm$ 28	-	83 $\pm$ 28***	46	81 $\pm$ 28***	47
5	137 $\pm$ 26	-	85 $\pm$ 36**	38	101 $\pm$ 19*	26

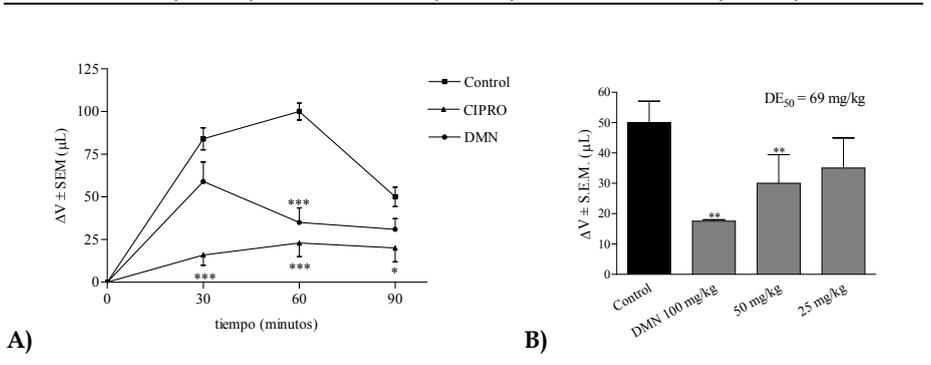


### IV.1.7. Edema inducido por PLA<sub>2</sub> en pata de ratón

Desmetilnobiletina, administrada vía oral (100 mg/kg), redujo significativamente el edema un 65% a los 60 min, mientras que a los 30 min el efecto fue más moderado, con un 30% de inhibición. El efecto antiinflamatorio resultó dosis-dependiente, siendo la DE<sub>50</sub> de 69 mg/kg para los 60 min.

**Tabla IV.10.** Efecto de los productos sobre el edema inducido por inyección subcutánea de PLA<sub>2</sub> en pata de ratón. A) DMN (100 mg/kg), CIPRO (10 mg/kg) a 30 min, 60 min y 90 min. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 6 animales. B) Efecto de DMN a los 60 min después de la inyección de PLA<sub>2</sub>. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 6 animales

minutos	Control		CIPRO (10 mg/kg)		DMN (100 mg/kg)	
	$\Delta$ Edema	%I	$\Delta$ Edema	%I	$\Delta$ Edema	%I
30	84,0 ± 11,6	-	14,0 ± 16,0 <sup>***</sup>	83	59,0 ± 0,8	30
60	100,0 ± 14,0	-	10,0 ± 12,4 <sup>***</sup>	90	35,0 ± 1,0 <sup>***</sup>	65
90	50,0 ± 14,7	-	20,0 ± 17,1 <sup>*</sup>	60	31,0 ± 14,7	38



## IV.2. Ensayos *in vitro*

### IV.2.1. Ensayo de citotoxicidad

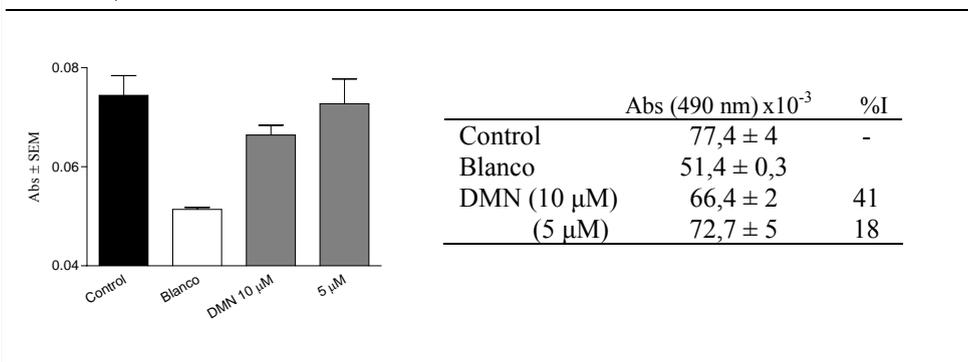
La flavona, a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  no resultó citotóxica, dando un porcentaje de viabilidad celular superior al 95%. Por este motivo, en los experimentos en los que deseemos ver su actividad a concentraciones en las que ésta no induzca la muerte celular, la máxima concentración empleada será de 10  $\mu\text{M}$ .

Por su lado, la viabilidad celular no se vio afectada por el contacto con los iridoides a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y por tanto esta será la concentración máxima empleada.

### IV.2.2. Ensayo de liberación/ actividad elastasa

5-*O*-Desmetilnobiletina a 10  $\mu\text{M}$  inhibió un 41% la liberación de elastasa en neutrófilos humanos y a 5  $\mu\text{M}$  lo hizo en un 18%, sin afectar la actividad enzimática. (Tabla IV.11).

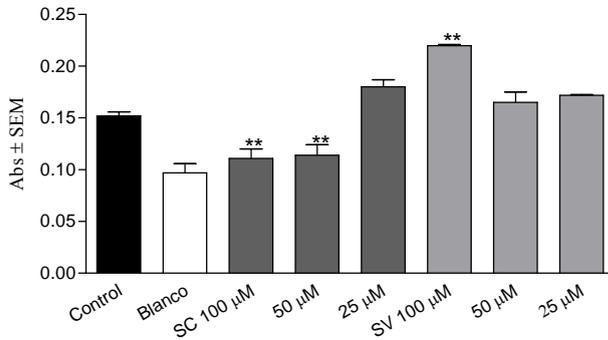
**Tabla IV.11.** Efecto de DMN en la liberación de elastasa. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.



Así mismo, el iridoide SC inhibió significativamente la liberación de la enzima un 74% y un 69% a 100  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente, no así a 25  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, el SV lejos de inhibir su liberación la promueve. Ninguno de los dos afectó la actividad elastasa (Tabla IV.12).

**Tabla IV.12.** Efecto de SC y SV en la liberación de elastasa. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett);  $n = 3$  experimentos individuales.

	Abs (490 nm) $\times 10^{-3}$	%I
Control	152 $\pm$ 40	-
Blanco	97 $\pm$ 8,7	
SC (100 $\mu\text{M}$ )	111 $\pm$ 9**	74
(50 $\mu\text{M}$ )	114 $\pm$ 10**	69
(25 $\mu\text{M}$ )	180 $\pm$ 7	- 51
SV (100 $\mu\text{M}$ )	220 $\pm$ 1**	-123
(50 $\mu\text{M}$ )	165 $\pm$ 10	- 24
(50 $\mu\text{M}$ )	172 $\pm$ 0,7	-36



### IV.2.31. Efecto sobre la actividad de 5-LOX en PMNs de rata

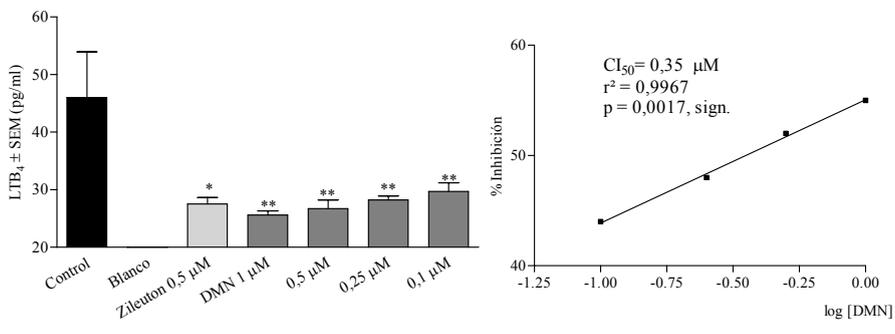
▪ **Ensayo en célula entera**

La flavona inhibió la liberación de LTB<sub>4</sub> de forma significativa a las concentraciones empleadas, llegando a inhibir un 88% a 10 μM y siendo su CI<sub>50</sub> de 0,35 μM (Tabla IV.13).

Tanto el escropoliósido como el escrovalentinósido inhibieron significativamente producción de LTB<sub>4</sub> siendo sus CI<sub>50</sub> de 70,4 μM y 60,7 μM respectivamente (Tabla IV.14).

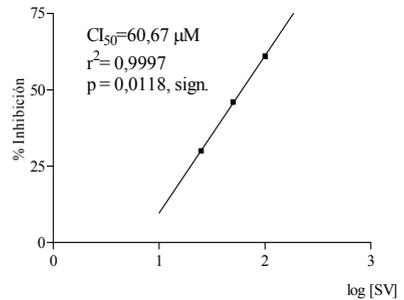
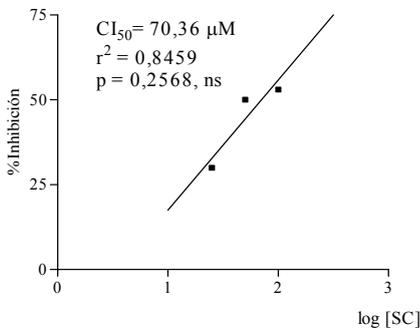
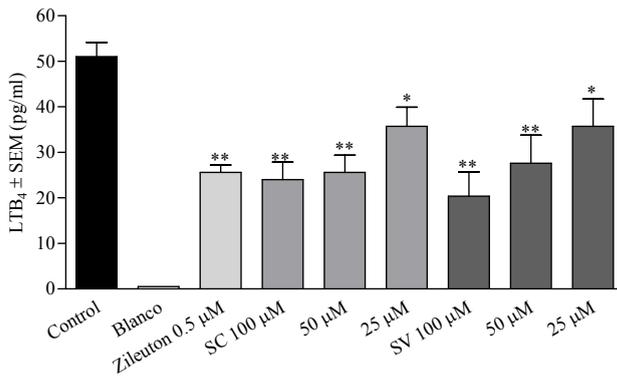
**Tabla IV.13.** Efecto de DMN sobre la producción de LTB<sub>4</sub>. \*\* *P* < 0,01; \* *P* < 0,05 (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	LTB <sub>4</sub> (pg/ml)	%I
Control	46,0 ± 21,0	-
Blanco	0,9 ± 0,2	
Zileuton (0,5 μM)	27,5 ± 2,0*	50
DMN (1 μM)	25,6 ± 2,0**	55
(0,5 μM)	26,7 ± 4,0**	52
(0,25 μM)	28,2 ± 2,0**	48
(0,1 μM)	29,7 ± 4,0**	44



**Tabla IV.14.** Efecto de SC y SV sobre producción de LTB<sub>4</sub>. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	LTB <sub>4</sub> (pg/ml)	%I
Control	51,0 ± 6,2	-
Blanco	0,5 ± 0,1	
Zileuton (0,5 μM)	25,6 ± 3,2 **	50
SC (100 μM)	24,0 ± 6,7 **	53
(50 μM)	25,6 ± 6,5 **	50
(25 μM)	35,7 ± 7,3 *	30
SV (100 μM)	2,0 ± 0,9 **	61
(50 μM)	2,7 ± 1,1 **	46
(25 μM)	3,6 ± 1,0 *	30



▪ **Ensayo en homogenado celular**

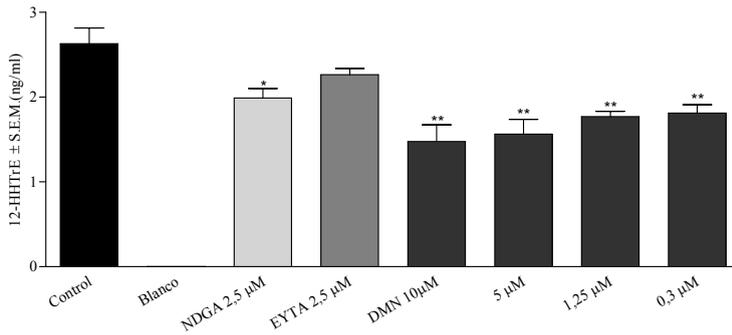
Se estudió el efecto de la flavona en homogenado celular para ver su efecto directo sobre la enzima 5-LOX. DMN inhibió significativamente la liberación de LTB<sub>4</sub> un 57% a 0,25 μM. Los iridoides, sin embargo, no tuvieron efecto en la enzima. Por lo tanto, el efecto sobre la producción de LTB<sub>4</sub> ocurre a otro nivel.

**IV.2.4. Efecto sobre la actividad de COX-1 y 12-LOX en plaquetas de rata**

El estudio de DMN sobre la actividad COX-1 y 12-LOX se realizó midiendo la concentración de sus metabolitos, 12-HHTrE y 12-HETE, respectivamente. La flavona a 10 μM inhibió significativamente la liberación de 12-HHTrE un 44% (Tabla IV.15) y un 49% la de 12-HETE (Tabla IV.16). El fármaco de referencia NDGA a 2,5 μM (inhibidor inespecífico de LOX), inhibió significativamente la liberación de 12-HETE un 76%, siendo de esperar que no tuviera prácticamente efecto en la liberación de 12-HHTrE. Sin embargo, el EYTA a 2,5 μM (inhibidor de COX y LOX), no mostró actividad significativa.

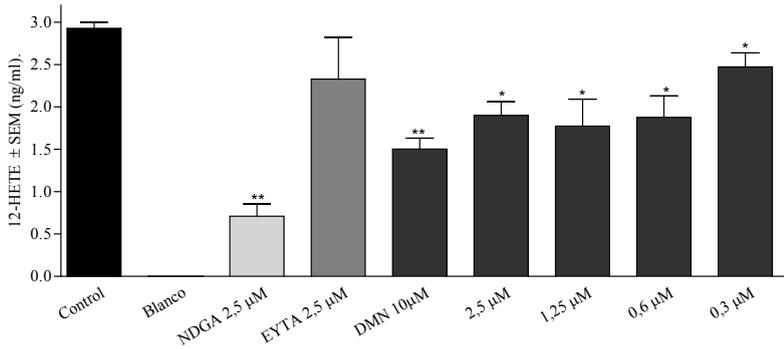
**Tabla IV.15.** Efecto de DMN sobre la actividad COX-1 mediante la medida de la liberación de 12-HHTrE. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett);  $n = 3$  experimentos individuales.

	12-HHTrE (ng/ml)	%I
Control	$2,63 \pm 0,32$	-
Blanco	$0,00 \pm 0,00$	
NDGA (2,5 $\mu$ M)	$1,99 \pm 0,19^*$	24
EYTA (2,5 $\mu$ M)	$2,26 \pm 0,13$	14
DMN (10 $\mu$ M)	$1,47 \pm 0,35^{**}$	44
(5 $\mu$ M)	$1,56 \pm 0,30^{**}$	40
(1,25 $\mu$ M)	$1,77 \pm 0,11^{**}$	33
(0,3 $\mu$ M)	$1,81 \pm 0,17^{**}$	31



**Tabla IV.16.** Efecto de DMN sobre la actividad 12-LOX mediante la medida de la liberación de 12-HETE. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett);  $n = 3$  experimentos individuales.

	12-HETE (ng/ml)	%I
Control	$2,93 \pm 0,12$	-
Blanco	$0,00 \pm 0,00$	-
NDGA (2,5 $\mu$ M)	$0,71 \pm 0,25^{**}$	76
EYTA (2,5 $\mu$ M)	$2,33 \pm 0,85$	20
DMN (10 $\mu$ M)	$1,50 \pm 0,21^{**}$	49
(2,5 $\mu$ M)	$1,90 \pm 0,28^*$	35
(1,25 $\mu$ M)	$1,77 \pm 0,55^*$	39
(0,6 $\mu$ M)	$1,87 \pm 0,44^*$	36
(0,3 $\mu$ M)	$2,47 \pm 0,28^*$	16



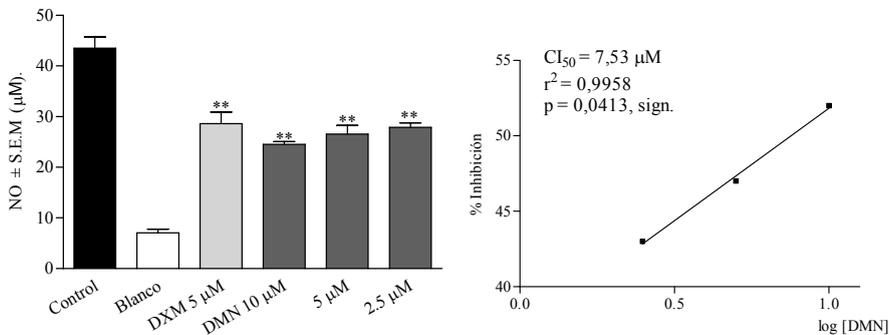
### IV.2.5. Inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7

La actividad enzimática de la iNOS, medida como la liberación de NO fue inhibida por el flavonoide de forma significativa siendo su  $CI_{50}$  de  $7,53 \mu\text{M}$  (Tabla IV.17).

Los iridoides también inhibieron la liberación de NO por la enzima siendo la  $CI_{50}$  del SC de  $78,1 \mu\text{M}$  y la del SV de  $68,7 \mu\text{M}$  (Tabla IV.18).

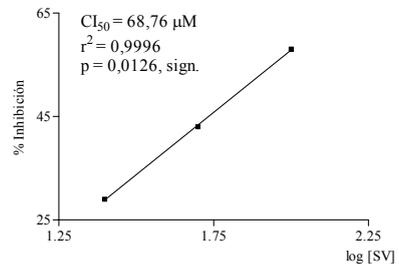
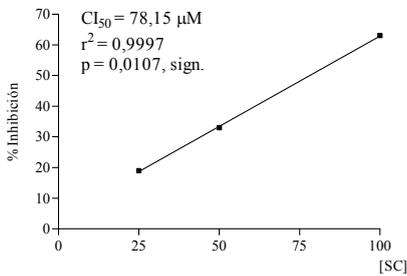
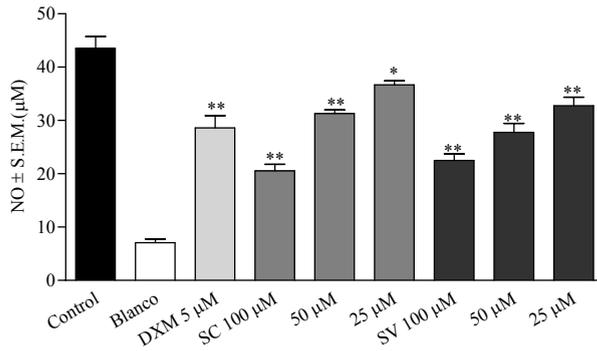
**Tabla IV.17.** Efecto de DMN sobre la actividad iNOS mediante la medida de la liberación de NO. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	NO ( $\mu\text{M}$ )	%I
Control	$43,5 \pm 5,5$	-
Blanco	$7,07 \pm 1,2$	
DXM ( $5 \mu\text{M}$ )	$28,6 \pm 4,0^{**}$	41
DMN ( $10 \mu\text{M}$ )	$24,5 \pm 1,4^{**}$	52
( $5 \mu\text{M}$ )	$26,5 \pm 4,8^{**}$	47
( $2,5 \mu\text{M}$ )	$27,9 \pm 2,4^{**}$	43



**Tabla IV.18.** Efecto de SC y SV sobre la actividad iNOS mediante la medida de la liberación de NO. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	NO ( $\mu\text{M}$ )	%I
Control	43,5 $\pm$ 5,5	-
Blanco	7,07 $\pm$ 1,2	
DXM (5 $\mu\text{M}$ )	28,6 $\pm$ 4,0 **	41
SC (100 $\mu\text{M}$ )	20,5 $\pm$ 3,6 **	63
(50 $\mu\text{M}$ )	31,3 $\pm$ 1,6 **	33
(25 $\mu\text{M}$ )	36,7 $\pm$ 1,7 *	19
SV (100 $\mu\text{M}$ )	22,5 $\pm$ 3,6 **	58
(50 $\mu\text{M}$ )	27,8 $\pm$ 4,4 **	43
(25 $\mu\text{M}$ )	32,8 $\pm$ 3,9 **	29



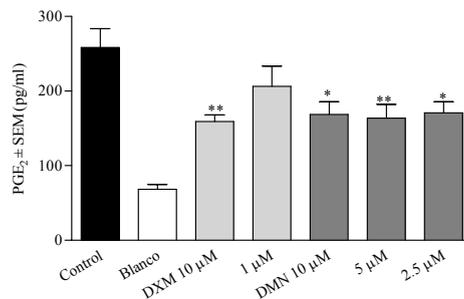
### IV.2.6. Efecto sobre la actividad de COX-2 en macrófagos RAW 264.7

El ensayo de los productos sobre la actividad de la COX-2 se llevó a cabo cuantificando la liberación de PGE<sub>2</sub>. Así, desmetilnobiletina inhibió significativamente la producción de este metabolito a 5 µM un 50%, aunque esta no es un dato representativo de su CI<sub>50</sub>, ya que a 10 µM inhibió un 47% y a 2,5 µM lo hizo en un 46%, con lo cual son porcentajes de inhibición muy similares para rangos de concentraciones amplios y no se pudo determinar su CI<sub>50</sub> (Tabla IV.19).

Por su parte, ambos iridoides inhibieron el 30% la producción de PGE<sub>2</sub> a 50 µM de forma no significativa (Tabla IV.20).

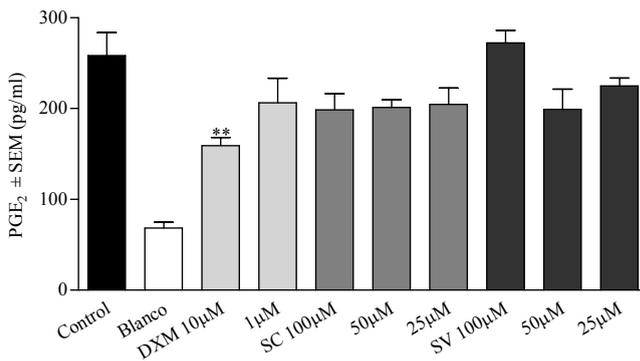
**Tabla IV.19.** Efecto de DMN sobre la producción de PGE<sub>2</sub> \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n=3 experimentos individuales.

	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	%I
Control	258,26 ± 62,15	-
Blanco	68,26 ± 11,38	
DXM (10 µM)	159,11 ± 20,19 **	52
(1 µM)	206,44 ± 60,16	27
DMN (10 µM)	168,71 ± 41,45 *	47
(5 µM)	163,60 ± 45,46 **	50
(2,5 µM)	170,91 ± 36,11 *	46



**Tabla IV.20.** Efecto de SC y SV sobre la producción de PGE<sub>2</sub> \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	%I
Control	258,26 ± 62,15	-
Blanco	68,26 ± 11,38	
DXM (10 µM)	159,11 ± 20,19 **	52
(1 µM)	206,44 ± 60,16	27
SC (100 µM)	198,54 ± 43,84	31
(50 µM)	201,19 ± 17,02	30
(25 µM)	204,66 ± 43,75	28
SV (100 µM)	272,25 ± 34,02	-7
(50 µM)	199,24 ± 54,29	31
(25 µM)	224,87 ± 21,50	18



### IV.2.7. Inhibición de la expresión de la óxido sintasa inducible (iNOS) y de la COX-2 en RAW 264.7

Mediante el ensayo de Western Blot se observa si los productos afectan directamente a la enzima, permitiendo o no su inducción. En este sentido, 5-O-desmetilnobiletina a 5  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto moderado sobre la iNOS así como sobre la COX-2, inhibiendo la expresión enzimática un 17% y 20% respectivamente (Fig. IV.10).

SC a 100  $\mu\text{M}$  inhibió un 33% la expresión de la iNOS y un 41% la COX-2 (Fig. IV.11). Sin embargo, el SV tan sólo inhibió un 13% y 22% la expresión de las enzimas iNOS y la COX-2, respectivamente (Fig. IV.12).

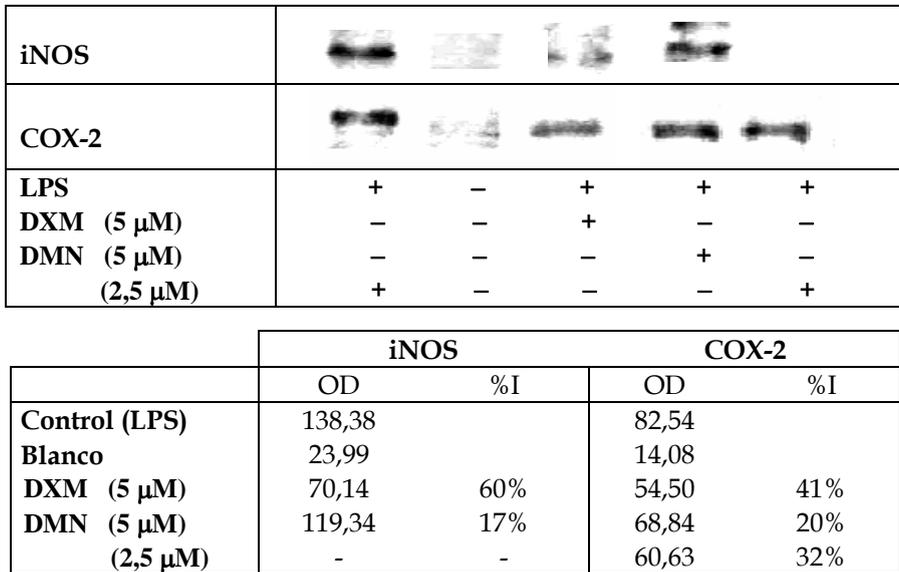


Fig. IV.10. Western blot de iNOS y COX-2. Inhibición de la expresión enzimática por efecto de DMN

iNOS		
COX-2		
LPS	+	-
DXM (5 µM)	-	-
SC (100 µM)	-	-

	iNOS		COX-2	
	OD	%I	OD	%I
Control (LPS)	110,44		139,64	
Blanco	14,66		5,75	
DXM 5 µM	78,39	33%	50,5	67%
SC 100 µM	78,61	33%	84,13	41%

Fig. IV.11. Western Blot de iNOS y COX-2. Inhibición de la expresión enzimática por efecto de SC.

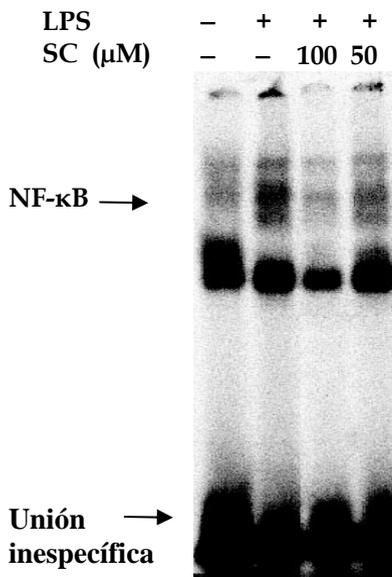
iNOS		
COX-2		
LPS	+	-
DXM (5 µM)	-	-
SV (100 µM)	-	-

	iNOS		COX-2	
	OD	%I	OD	%I
Control (LPS)	107,75		165,63	
Blanco	13,28		4,15	
DXM 5 µM	77,01	33%	67,20	61%
SV 100 µM	95,63	13%	129,91	22%

Fig. IV.12. Western Blot de iNOS y COX-2. Inhibición de la expresión enzimática por efecto de SV.

#### IV.2.8. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) en macrófagos RAW 264.7

Tal y como cabía esperar tras los resultados obtenidos de la inhibición de la expresión enzimática (iNOS y COX-2), el único producto que inhibió el NF- $\kappa$ B fue el SC, con un efecto muy marcado a 100  $\mu$ M.



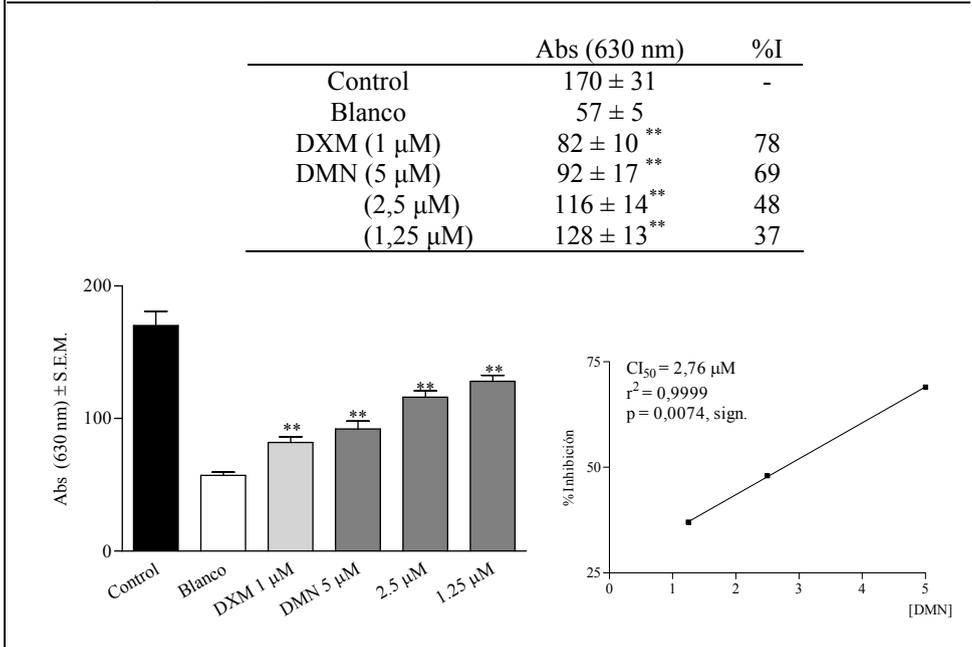
**Fig. IV.13.** EMSA. Inhibición de la activación NF- $\kappa$ B por efecto de SC en macrófagos RAW 264.7.

### IV.2.9. Inhibición de la proliferación linfocitaria

El flavonoide inhibió significativamente la proliferación de linfocitos estimulados con el agente mitógeno PHA, siendo su  $CI_{50}$  de  $2,76 \mu\text{M}$  (Tabla IV.21).

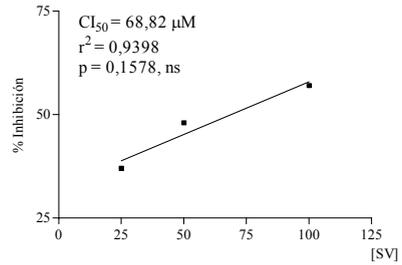
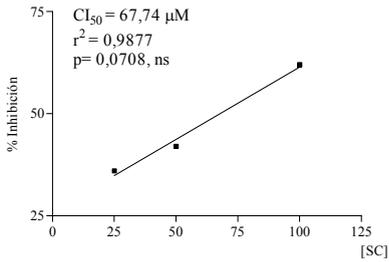
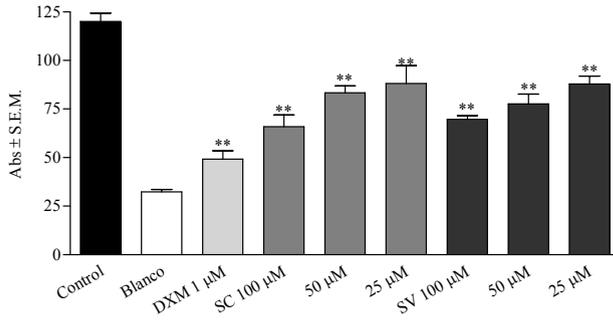
Ambos iridoides mostraron efecto sobre la linfoproliferación, con una potencia muy similar, siendo la  $CI_{50}$  del SC de  $67,7 \mu\text{M}$  y la del SV de  $68,8 \mu\text{M}$  (Tabla IV.22).

**Tabla IV.21.** Efecto de DMN en la proliferación linfocitaria. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.



**Tabla IV.22.** Efecto de SC y SV en la proliferación linfocitaria. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales.

	Abs (630 nm)	%I
Control	120 ± 10	-
Blanco	32 ± 2	
DXM (1 µM)	49 ± 10**	81
SC (100 µM)	66 ± 17**	62
(50 µM)	83 ± 9**	42
(25 µM)	88 ± 22**	36
SV (100 µM)	70 ± 5**	57
(50 µM)	78 ± 14**	48
(25 µM)	88 ± 11**	37



#### **IV.2.10. Efecto sobre el ciclo celular en linfocitos**

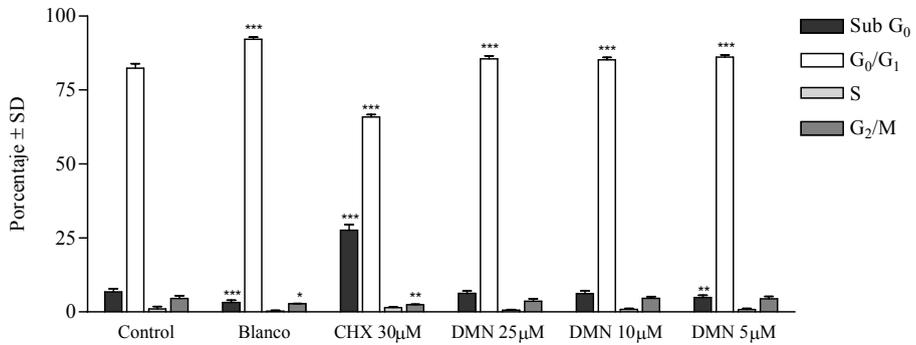
- **Efecto en función de la concentración**

El flavonoide a las 24 h no ejerce a penas efecto en el progreso del ciclo celular (Tabla IV.23). Sin embargo, a las 72 h se ve claramente una disminución de los picos correspondientes a las fases de síntesis y mitosis, con el consecuente aumento del pico  $G_0/G_1$  y a su vez un ligero incremento en el sub $G_0$ , que es el de la fase de apoptosis. A 25  $\mu\text{M}$  se observa un incremento de esta fase de apoptosis y posiblemente como consecuencia una disminución en la de síntesis (Tabla IV.25). Pero en general, los datos para las diferentes concentraciones son muy similares.

Los iridoides siguen un comportamiento muy similar, y al igual que el flavonoide, su efecto es más marcado a las 72 h (Tabla IV.24). Ambos redujeron la fase de mitosis fundamentalmente y sin efecto significativo sobre el pico sub  $G_0$ . No existe gran diferencia en la actividad a distintas concentraciones, excepto el SV que a 50  $\mu\text{M}$  redujo con más intensidad el pico S e incrementó el número de células en la fase  $G_0/G_1$  que a 100  $\mu\text{M}$  (Tabla IV.26).

**Tabla IV.23.** Efecto de DMN (25  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) sobre el ciclo celular a las 24 h. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni );  $n = 3$  experimentos individuales.  $10^4$  células/ muestra.

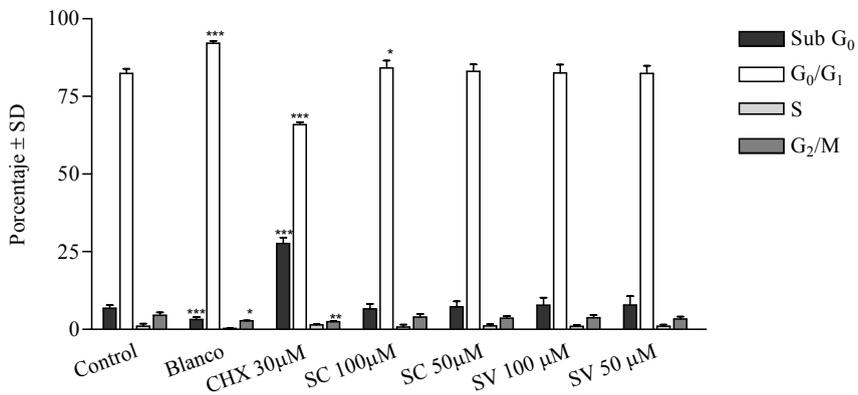
	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	6,78 $\pm$ 0,97	82,37 $\pm$ 1,5	1,03 $\pm$ 0,87	4,57 $\pm$ 0,91
Blanco	3,22 $\pm$ 0,71***	92,16 $\pm$ 0,69***	0,31 $\pm$ 0,10	2,77 $\pm$ 0,13*
CHX (30 $\mu$ M)	27,65 $\pm$ 1,88***	65,90 $\pm$ 0,83***	1,44 $\pm$ 0,19	2,43 $\pm$ 0,21**
DMN (25 $\mu$ M)	6,70 $\pm$ 0,87	85,53 $\pm$ 1,01***	0,66 $\pm$ 0,16	3,66 $\pm$ 0,82
(10 $\mu$ M)	6,24 $\pm$ 0,91	85,20 $\pm$ 0,86***	0,87 $\pm$ 0,31	4,60 $\pm$ 0,63
(5 $\mu$ M)	4,91 $\pm$ 0,69**	86,15 $\pm$ 0,72***	0,79 $\pm$ 0,43	4,48 $\pm$ 0,79



IV. RESULTADOS

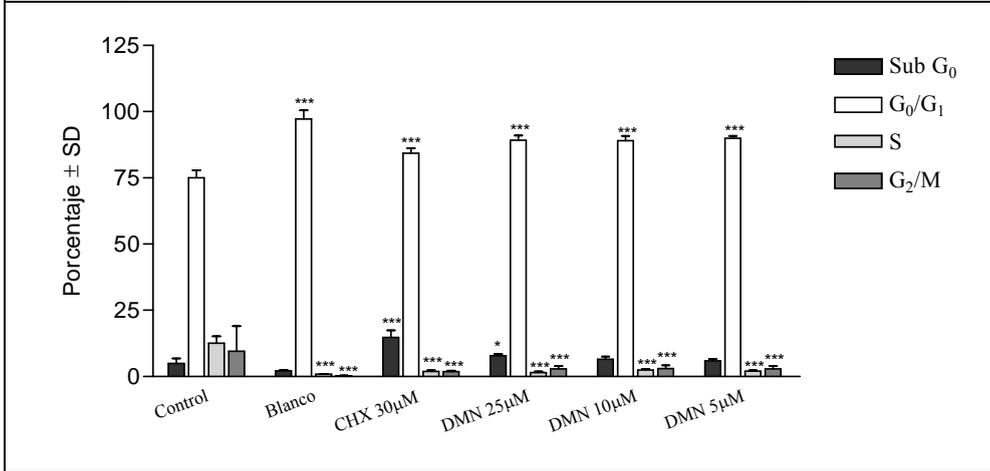
**Tabla IV.24.** Efecto de SC y SV (100  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) sobre el ciclo celular a las 24 h. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni ); n = 3 experimentos individuales.  $10^4$  células/ muestra.

	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	6,78 ± 0,97	82,37 ± 1,5	1,03 ± 0,87	4,57 ± 0,91
Blanco	3,22 ± 0,71***	92,16 ± 0,69***	0,31 ± 0,10	2,77 ± 0,13*
CHX (30 $\mu$ M)	27,65 ± 1,88***	65,90 ± 0,83***	1,44 ± 0,19	2,43 ± 0,21**
SC (100 $\mu$ M)	6,66 ± 1,52	84,11 ± 2,47*	0,75 ± 0,75	3,96 ± 0,96
(50 $\mu$ M)	7,25 ± 1,78	83,06 ± 2,25	1,13 ± 0,57	3,66 ± 0,62
SV (100 $\mu$ M)	7,79 ± 2,45	82,52 ± 2,72	0,98 ± 0,40	3,83 ± 0,8
(50 $\mu$ M)	7,86 ± 2,87	82,39 ± 2,46	1,00 ± 0,54	3,39 ± 0,72



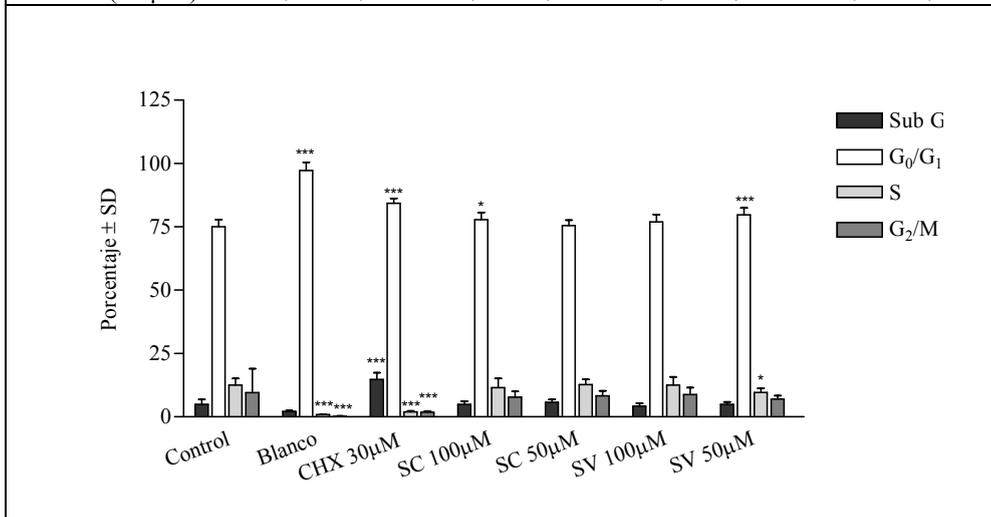
**Tabla IV.25.** Efecto de DMN (25  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) sobre el ciclo celular a las 72 h. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 3 experimentos individuales.  $10^4$  células/muestra.

	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	4,93 ± 1,93	75,02 ± 2,81	12,50 ± 2,67	9,51 ± 1,79
Blanco	2,12 ± 0,31	97,22 ± 3,20***	0,90 ± 0,10***	0,27 ± 0,10***
CHX (30 $\mu$ M)	14,78 ± 2,65***	84,28 ± 1,87***	1,92 ± 0,43***	1,86 ± 0,41***
DMN (25 $\mu$ M)	7,85 ± 0,59*	89,24 ± 1,72***	1,51 ± 0,38***	2,91 ± 0,95***
(10 $\mu$ M)	6,55 ± 1,02	89,05 ± 1,86***	2,45 ± 0,41***	2,99 ± 1,25***
(5 $\mu$ M)	5,84 ± 0,91	89,94 ± 0,95***	2,02 ± 0,34***	2,89 ± 1,06***



**Tabla IV.26.** Efecto de SC y SV (100  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) sobre el ciclo celular a las 72 h. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni ); n = 3 experimentos individuales.  $10^4$  células/muestra.

	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	4,93 ± 1,93	75,02 ± 2,81	12,50 ± 2,67	9,51 ± 1,79
Blanco	2,12 ± 0,31	97,22 ± 3,20***	0,90 ± 0,10***	0,27 ± 0,10***
CHX (30 $\mu\text{M}$ )	14,78 ± 2,65***	84,28 ± 1,87***	1,92 ± 0,43***	1,86 ± 0,41***
SC (100 $\mu\text{M}$ )	4,96 ± 1,19	77,90 ± 2,79*	12,53 ± 3,58	7,78 ± 2,27
(50 $\mu\text{M}$ )	5,83 ± 1,02	75,42 ± 2,21	12,81 ± 1,92	8,27 ± 2,03
SV (100 $\mu\text{M}$ )	4,20 ± 1,12	76,96 ± 2,91	12,53 ± 3,27	8,77 ± 2,78
(50 $\mu\text{M}$ )	4,95 ± 0,98	79,71 ± 2,76***	9,67 ± 1,62*	7,02 ± 1,32



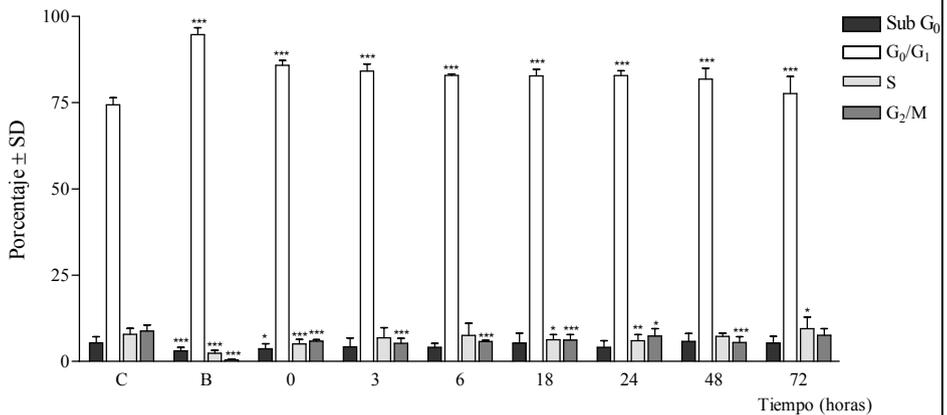
▪ **Efecto en función del tiempo**

Tal y como se puede apreciar, tanto en la tabla como en el gráfico, el efecto inhibitorio de desmetilnobiletina sobre el ciclo celular es mayor cuanto menos tiempo transcurre desde que las células son estimuladas hasta que se tratan con el compuesto. Así pues, el pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> es mayor a cuando a las 0 h de haber estimulado las células se tratan con el compuesto. También se ve un ligero aumento en la fase de apoptosis, pero este efecto es mayor a las 72 h de estimulación, es decir cuantas más

células estimuladas hay, más entran en apoptosis. Se observa una disminución de los picos S y M, siendo el efecto más marcado en éste último (Tabla IV.27).

**Tabla IV.27.** Efecto de DMN (10  $\mu$ M) sobre el ciclo celular a distintos tiempos de exposición, una vez estimulados los linfocitos con PHA. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni);  $n = 3$  experimentos individuales.  $10^4$  células/muestra.

	Tiempo (h)	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	72	5,37 $\pm$ 1,04	78,41 $\pm$ 1,16	7,87 $\pm$ 0,96	8,74 $\pm$ 1,05
Blanco	72	3,11 $\pm$ 0,56***	94,69 $\pm$ 1,18***	2,38 $\pm$ 0,47***	0,48 $\pm$ 0,1***
	0	3,67 $\pm$ 0,83*	85,78 $\pm$ 0,84***	5,02 $\pm$ 0,77***	5,89 $\pm$ 0,26***
	3	4,21 $\pm$ 1,48	84,13 $\pm$ 1,18***	6,82 $\pm$ 1,69	5,23 $\pm$ 0,83***
	6	4,11 $\pm$ 1,48	82,92 $\pm$ 0,25***	7,53 $\pm$ 2,04	5,73 $\pm$ 0,19***
DMN(10 $\mu$ M)	18	5,31 $\pm$ 1,65	82,78 $\pm$ 1,08***	6,24 $\pm$ 0,89*	6.16 $\pm$ 0,92***
	24	4,08 $\pm$ 1,11	82,80 $\pm$ 0,82***	6,00 $\pm$ 1,0**	7,31 $\pm$ 1,26*
	48	5,81 $\pm$ 1,31	81,81 $\pm$ 1,82***	7,24 $\pm$ 0,53	5,51 $\pm$ 0,93***
	72	5,30 $\pm$ 1,13	77,63 $\pm$ 2,87***	9,52 $\pm$ 1,91*	7,59 $\pm$ 1,08

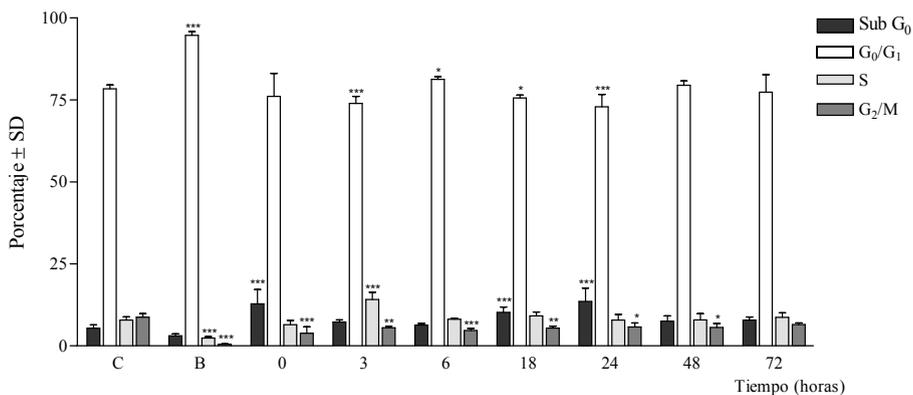


En este experimento, el tratamiento de las células con SC produce un aumento muy notorio en la fase de apoptosis, sobretodo para los

tiempos 0 h, 18 h y 24 h, a los que se adiciona el producto. No se ve un aumento del pico  $G_0/G_1$ , posiblemente por lo que se acaba de comentar, las células han pasado al pico sub  $G_0$ . Sin embargo, se ve una disminución en la fase de mitosis (Tabla IV.28). SV no muestra tanto efecto inhibitorio sobre el ciclo celular como SC, disminuyendo en paso de células del pico S al M (Tabla IV.29).

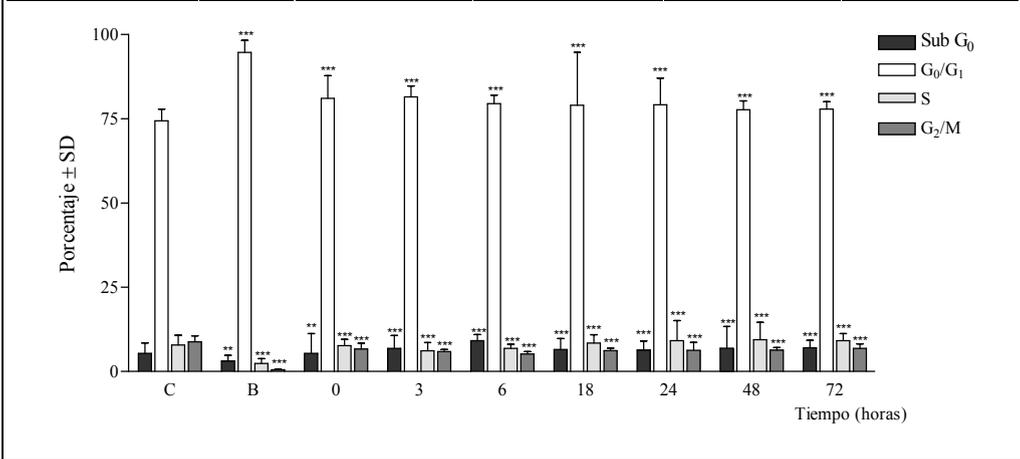
**Tabla IV.28.** Efecto de SC (100  $\mu$ M) sobre el ciclo celular a distintos tiempos de exposición, una vez estimulados los linfocitos con PHA. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 3 experimentos individuales.  $10^4$  células/muestra.

	Tiempo (h)	Sub $G_0$	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
Control (PHA)	72	5,24 $\pm$ 1,00	78,28 $\pm$ 1,13	7,74 $\pm$ 0,92	8,74 $\pm$ 1,04
Blanco	72	2,89 $\pm$ 0,49	94,69 $\pm$ 1,13***	2,15 $\pm$ 0,45***	0,27 $\pm$ 0,08***
	0	12,82 $\pm$ 4,37***	76,36 $\pm$ 7,00	6,71 $\pm$ 1,34	4,11 $\pm$ 1,98***
	3	7,40 $\pm$ 0,62	74,14 $\pm$ 2,15***	13,51 $\pm$ 2,21***	4,94 $\pm$ 0,47**
	6	6,19 $\pm$ 0,51	81,26 $\pm$ 0,82*	8,08 $\pm$ 0,37	4,47 $\pm$ 0,61***
SC (100 $\mu$ M)	18	10,11 $\pm$ 1,60***	75,46 $\pm$ 1,91*	9,04 $\pm$ 1,16	5,39 $\pm$ 0,54**
	24	13,53 $\pm$ 4,11***	72,89 $\pm$ 3,78***	7,83 $\pm$ 1,70	5,75 $\pm$ 1,23*
	48	7,32 $\pm$ 1,61	79,38 $\pm$ 1,29	7,79 $\pm$ 1,89	5,51 $\pm$ 1,19*
	72	7,73 $\pm$ 0,99	77,24 $\pm$ 5,35	8,59 $\pm$ 1,40	6,44 $\pm$ 0,44



**Tabla IV.29.** Efecto de SV (100 µM) sobre el ciclo celular a distintos tiempos de exposición, una vez estimulados los linfocitos con PHA. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni); n = 3 experimentos individuales.  $10^4$  células/muestra.

	Tiempo (h)	Sub G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control (PHA)	72	5,37 ± 1,04	78,41 ± 1,16	7,87 ± 0,96	8,35 ± 1,05
Blanco	72	3,11 ± 0,56**	94,03 ± 1,18***	2,38 ± 0,47***	0,48 ± 0,10***
	0	5,38 ± 1,95**	80,33 ± 2,24***	7,66 ± 0,61***	6,63 ± 1,00***
	3	6,83 ± 1,26***	81,18 ± 1,08***	6,11 ± 0,80***	5,88 ± 0,35***
	6	9,09 ± 0,63***	78,95 ± 0,85***	6,80 ± 0,43***	5,16 ± 0,40***
	18	6,51 ± 1,07***	78,86 ± 5,21***	8,44 ± 0,82***	6,19 ± 0,40***
SV (100 µM)	24	6,29 ± 0,92***	78,34 ± 2,64***	9,12 ± 1,99***	6,25 ± 1,36***
	48	6,86 ± 2,15***	77,37 ± 0,86***	9,44 ± 1,72***	6,33 ± 0,43***
	72	7,01 ± 0,74***	77,04 ± 0,71***	9,13 ± 0,69***	6,82 ± 0,78***



#### IV.2.11. Efecto sobre la producción de TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4 e IL-10 en linfocitos humanos

La flavona inhibió la liberación de las citocinas pro-inflamatorias IL-2, -4, TNF-α e IFN-γ y aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en linfocitos estimulados con PHA. También inhibió la liberación de la IL-1β, sin embargo el efecto no fue dosis dependiente (Tabla IV.31). Se realizó el experimento de liberación de citocinas en linfocitos sin estimular y se vio que DMN promovía la

liberación de IL-1 $\beta$  de forma dosis-dependiente, a 10  $\mu$ M incrementaba la liberación de IL-10, también lo hacía para TNF- $\alpha$ , sin embargo a 5  $\mu$ M y más aún a 2,5  $\mu$ M inhibía esta citocina respecto al blanco (Tabla IV.30). La flavona no afectó los niveles basales de las otras citocinas ensayadas.

Los iridoides a 100  $\mu$ M disminuyeron a la mitad la producción de IL-10 en linfocitos no estimulados, también tuvieron el mismo efecto sobre el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , compartiendo efecto con la dexametasona, a excepción del TNF-  $\alpha$  que triplicó su concentración. No modificaron los niveles de las otras citocinas en linfocitos sin PHA e inhibieron la liberación de las citocinas ensayadas en linfocitos estimulados, a excepción de la IL-10, cuyos valores no experimentaron cambios respecto del control (Tabla. IV.32 y Tabla IV.33).

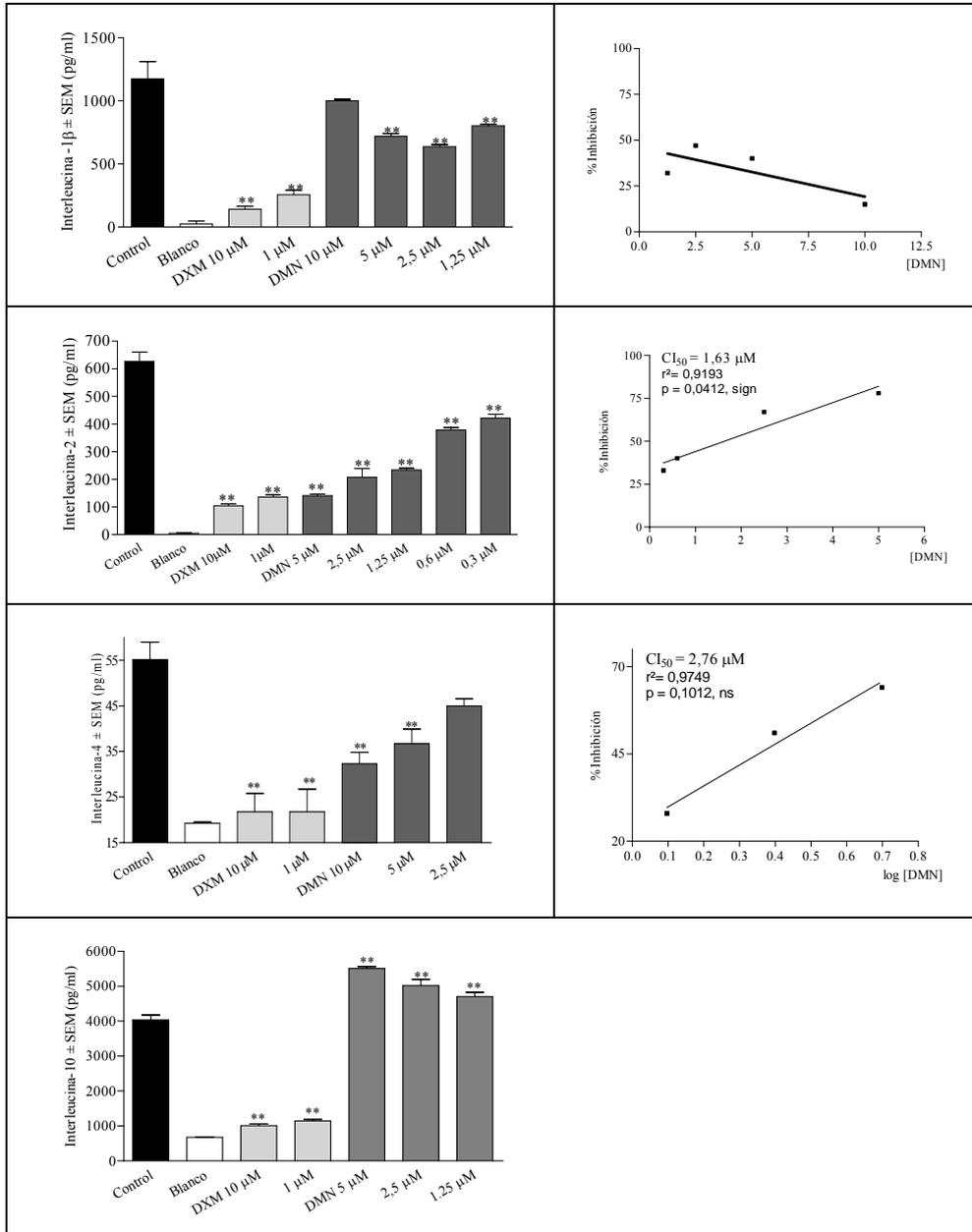
**Tabla IV.30.** Efecto de DMN, SC y SV sobre la producción de citocinas en linfocitos no estimulados. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett). Se comparó cada grupo con el blanco. n = 3 experimentos individuales

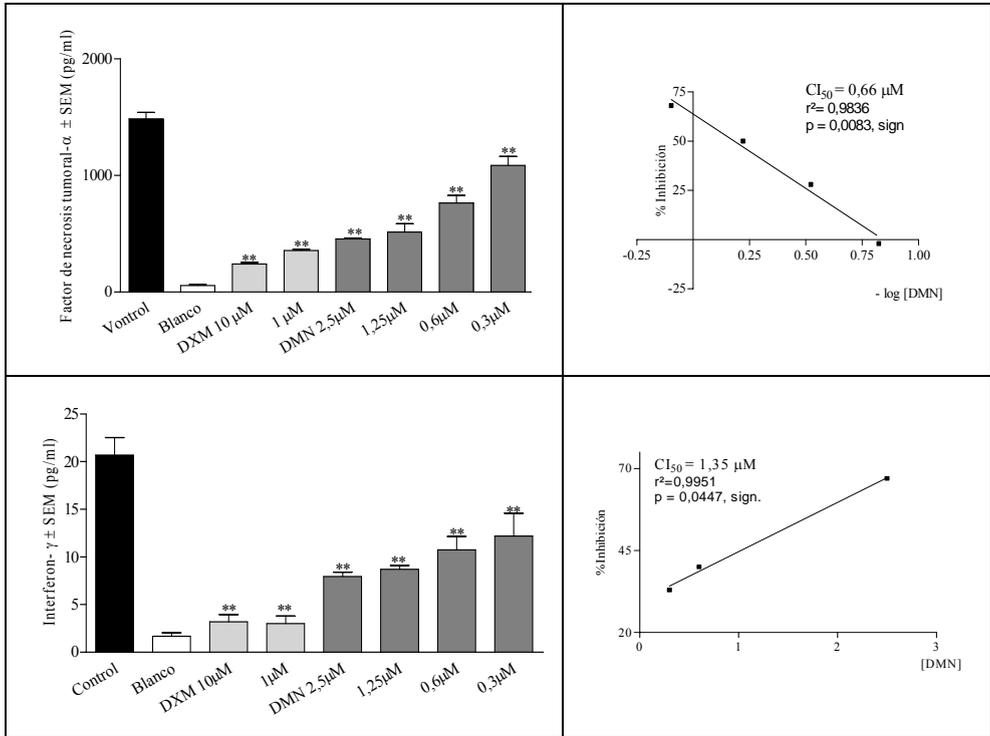
	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(pg/mL)	(ng/mL)
PHA	1427 $\pm$ 193	2630 $\pm$ 230	25 $\pm$ 3	4245 $\pm$ 175	1944 $\pm$ 360	11,42 $\pm$ 0,65
Blanco	10 $\pm$ 11	72 $\pm$ 6	14 $\pm$ 1	2020 $\pm$ 50	200 $\pm$ 6	0,91 $\pm$ 0,05
DXM 10 $\mu$ M	83 $\pm$ 89	66 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	587 $\pm$ 100**	663 $\pm$ 130**	0,44 $\pm$ 0,04*
DMN 10 $\mu$ M	745 $\pm$ 44**	63 $\pm$ 6	13 $\pm$ 0,5	2440 $\pm$ 300**	224 $\pm$ 50	1,03 $\pm$ 0,10
DMN 5 $\mu$ M	270 $\pm$ 110*	78 $\pm$ 9	14 $\pm$ 2	1577 $\pm$ 375**	149 $\pm$ 40	0,96 $\pm$ 0,15
DMN 2,5 $\mu$ M	180 $\pm$ 137	69 $\pm$ 4	14 $\pm$ 0,6	2137 $\pm$ 150	106 $\pm$ 20	0,95 $\pm$ 0,10
SC 100 $\mu$ M	6,06 $\pm$ 49	72 $\pm$ 6	16 $\pm$ 2	1087 $\pm$ 125**	80 $\pm$ 9	0,59 $\pm$ 0,02
SV 100 $\mu$ M	2,8 $\pm$ 23	82 $\pm$ 10	15 $\pm$ 2	1037 $\pm$ 100**	84 $\pm$ 10	0,56 $\pm$ 0,04

**Tabla IV.31.** Efecto de DMN sobre la producción de citocinas en linfocitos estimulados. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett)  $n = 3$  experimentos individuales. Los porcentajes negativos de inhibición quieren decir producción (IL-10)

	IL-1 $\beta$		IL-2		IL-4		IL-10		TNF- $\alpha$		IFN- $\gamma$		
	( $\mu$ M)	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(ng/mL)	I%
C		1175 $\pm$ 383		627 $\pm$ 95		55 $\pm$ 11		4039 $\pm$ 386		1486 $\pm$ 155		20,7 $\pm$ 4,9	
BI		26 $\pm$ 43		5 $\pm$ 3		19 $\pm$ 1		675 $\pm$ 17		56 $\pm$ 17		1,7 $\pm$ 0,8	
DXM 10		141 $\pm$ 50**	90	104 $\pm$ 11 **	84	22 $\pm$ 8**	92	1011 $\pm$ 99**	90	241 $\pm$ 28**	87	3,2 $\pm$ 1,5**	92
1		256 $\pm$ 73**	80	136 $\pm$ 14**	79	22 $\pm$ 10**	92	1146 $\pm$ 94**	86	356 $\pm$ 20**	79	3,0 $\pm$ 1,6**	93
DMN 10		1000 $\pm$ 26	15	323 $\pm$ 79	49	43 $\pm$ 9	34	5602 $\pm$ 171**	-46	371 $\pm$ 48**	78	3,9 $\pm$ 1,0**	88
5		719 $\pm$ 53**	40	141 $\pm$ 14**	78	32 $\pm$ 6**	64	5511 $\pm$ 152**	-44	414 $\pm$ 69**	75	5,8 $\pm$ 0,9**	78
2,5		636 $\pm$ 40**	47	208 $\pm$ 75**	67	37 $\pm$ 8**	51	5020 $\pm$ 507**	-29	456 $\pm$ 22**	73	3,9 $\pm$ 1,1**	67
1,25		802 $\pm$ 29**	32	234 $\pm$ 15**	63	45 $\pm$ 4	28	4704 $\pm$ 353**	-20	514 $\pm$ 178**	68	5,7 $\pm$ 1,0**	63
0,6				378 $\pm$ 23**	40					763 $\pm$ 160**	50	8,7 $\pm$ 3,4**	40
0,3				421 $\pm$ 35**	33					1085 $\pm$ 195**	28	9,5 $\pm$ 5,9**	33

## IV. RESULTADOS

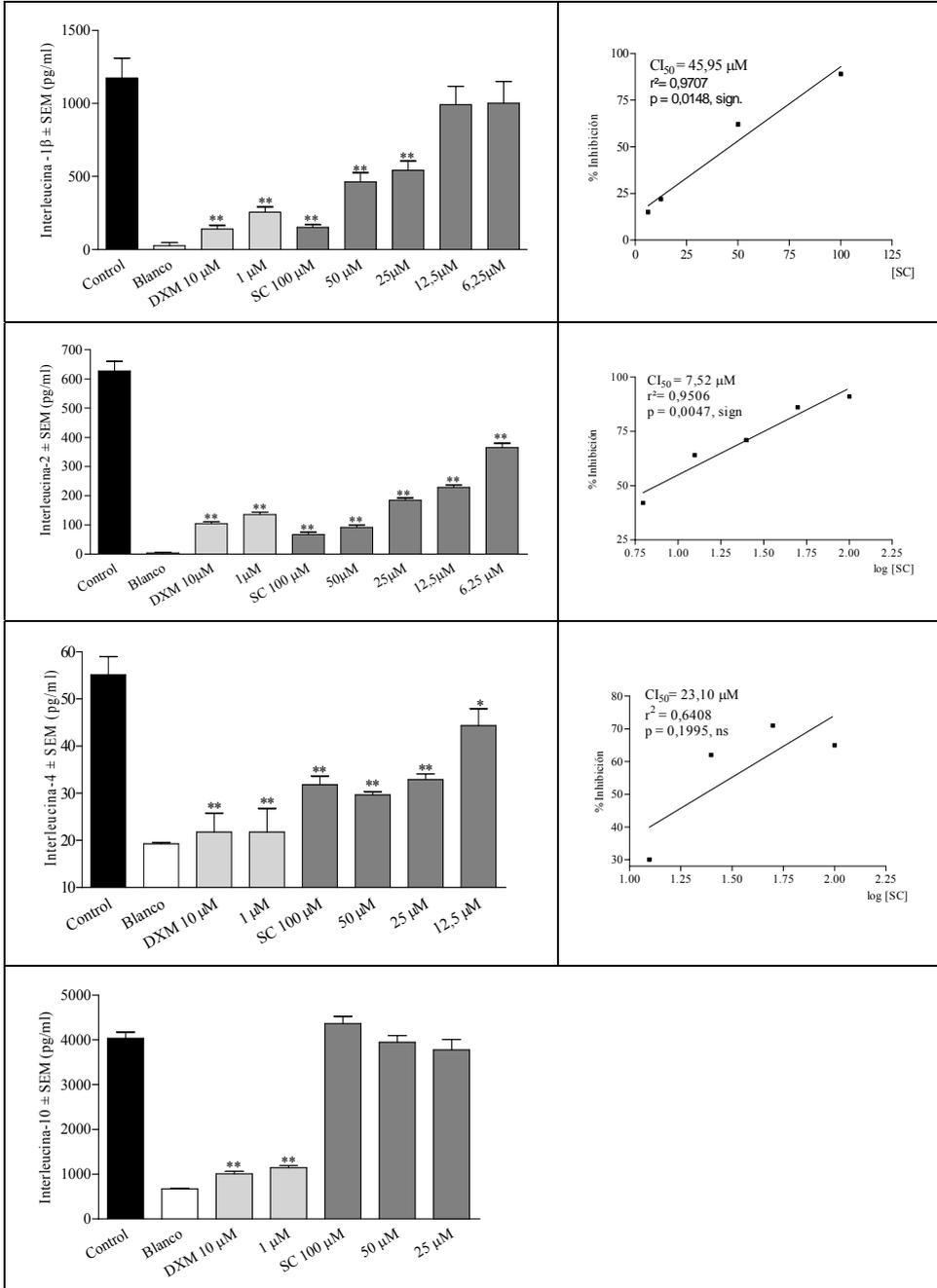




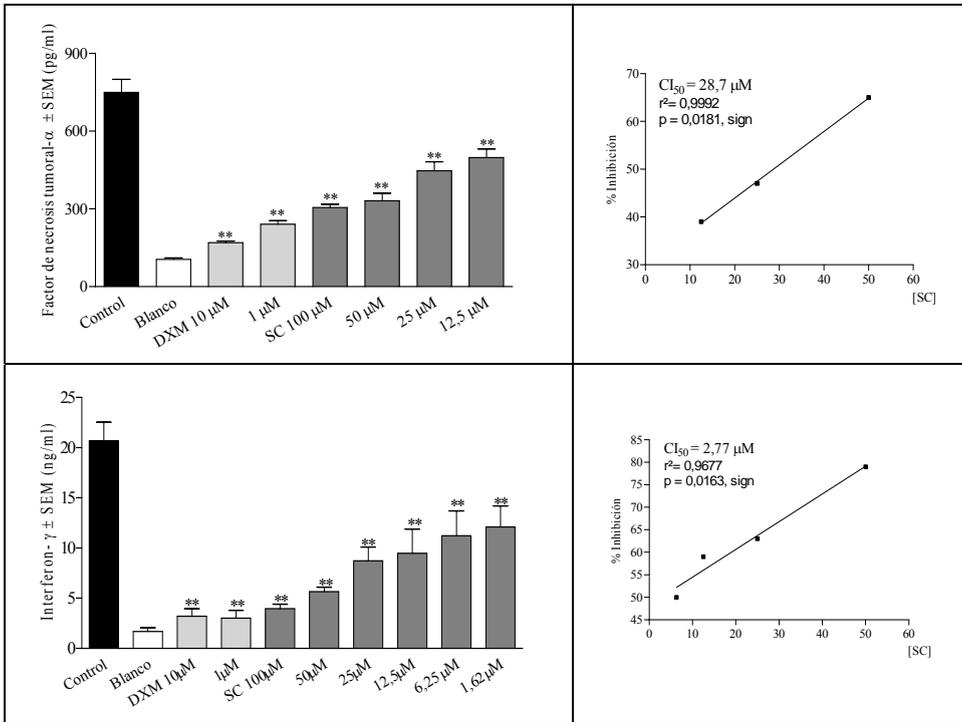
IV. RESULTADOS

**Tabla IV.32.** Efecto de SC sobre la producción de citocinas. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,5$  (t de Dunnett) n = 3 experimentos individuales

	IL-1 $\beta$		IL-2		IL-4		IL-10		TNF $\alpha$		IFN $\gamma$		
	( $\mu$ M)	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(ng/mL)	%I
C		1175 $\pm$ 383		627 $\pm$ 95		55 $\pm$ 11		4039 $\pm$ 386		750 $\pm$ 159		20,7 $\pm$ 4,9	
Bl		26 $\pm$ 43		5 $\pm$ 3		19 $\pm$ 1		675 $\pm$ 17		106 $\pm$ 35		1,7 $\pm$ 0,8	
DXM 10		141 $\pm$ 50**	90	104 $\pm$ 11**	84	22 $\pm$ 8**	92	1011 $\pm$ 99**	90	170 $\pm$ 12**	90	3,2 $\pm$ 1,5**	92
1		256 $\pm$ 73**	80	136 $\pm$ 4**	79	22 $\pm$ 10**	92	1146 $\pm$ 94**	86	241 $\pm$ 28**	79	3,0 $\pm$ 1,6**	93
SC 100		152 $\pm$ 50**	89	67 $\pm$ 23**	91	32 $\pm$ 4**	65	4364 $\pm$ 423	-10	305 $\pm$ 34**	69	3,9 $\pm$ 1,1**	88
50		462 $\pm$ 183**	62	92 $\pm$ 23**	86	30 $\pm$ 1**	71	3947 $\pm$ 424	3	331 $\pm$ 82**	65	5,7 $\pm$ 1,0**	79
25		543 $\pm$ 178**	55	185 $\pm$ 21**	71	33 $\pm$ 3**	62	3779 $\pm$ 659	8	447 $\pm$ 91**	47	8,7 $\pm$ 3,4**	63
12,5		992 $\pm$ 308	22	229 $\pm$ 23**	64	44 $\pm$ 9*	30			499 $\pm$ 92**	39	9,5 $\pm$ 5,9**	59
6,25		1002 $\pm$ 362	15	366 $\pm$ 35**	42							11,2 $\pm$ 6,1**	50
1,62												12,1 $\pm$ 4,2**	45



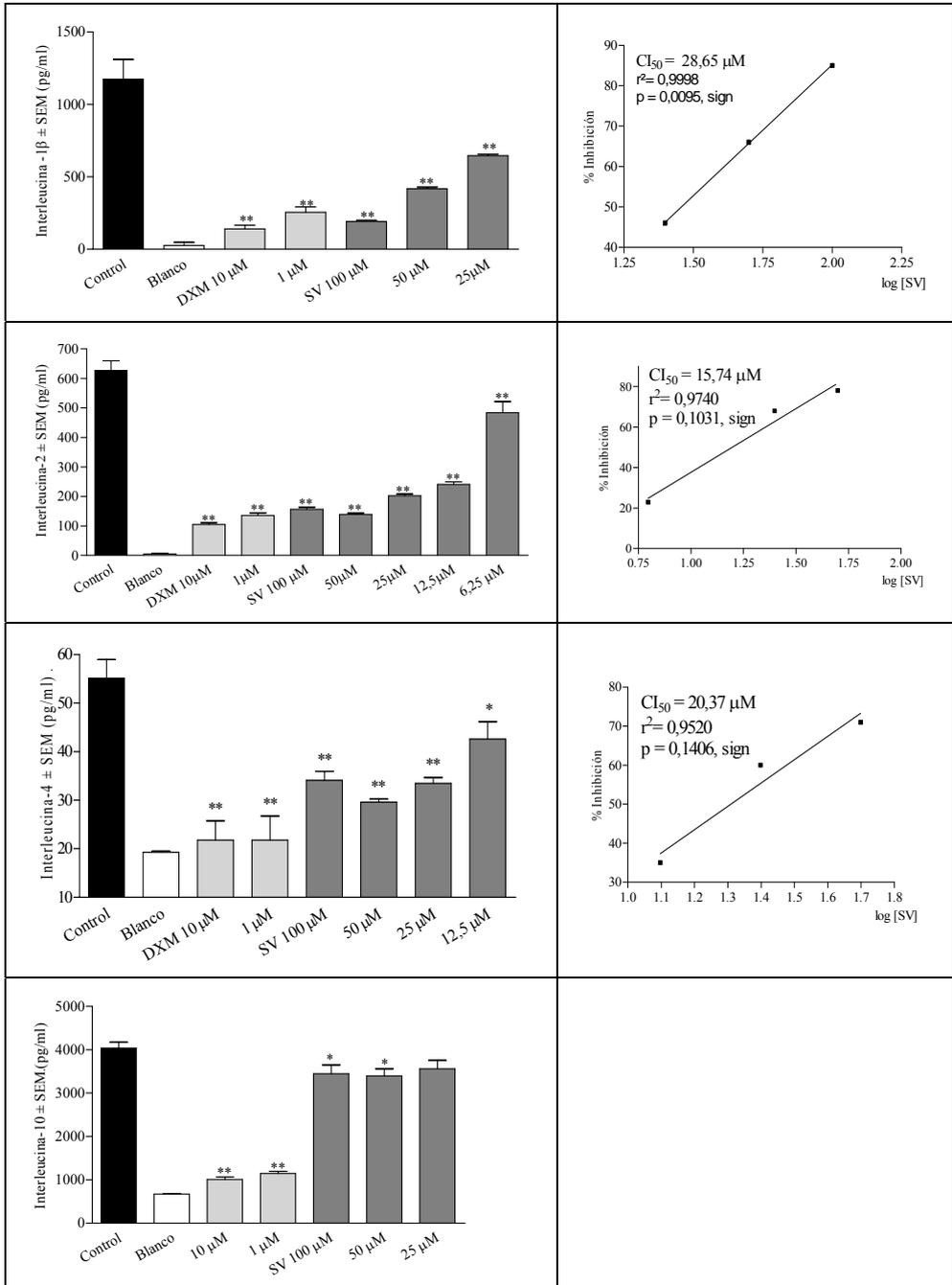
## IV. RESULTADOS

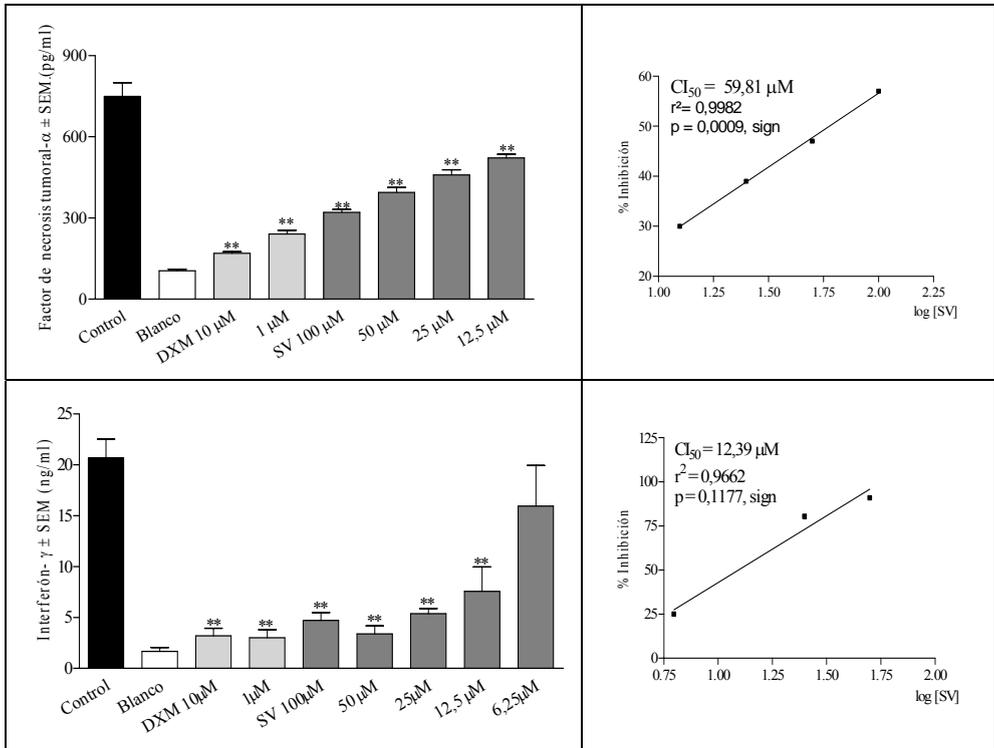


**Tabla IV.33.** Efecto de SV sobre la producción de citocinas. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett)  
n = 3 experimentos individuales.

	IL-1 $\beta$		IL-2		IL-4		IL-10		TNF $\alpha$		IFN $\gamma$		
	( $\mu$ M)	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(pg/mL)	%I	(ng/mL)	%I
C		1175 $\pm$ 383		627 $\pm$ 95		55 $\pm$ 11		4039 $\pm$ 386		750 $\pm$ 159		20,7 $\pm$ 4,9	
Bl		26 $\pm$ 43		5 $\pm$ 3		19 $\pm$ 1		675 $\pm$ 17		106 $\pm$ 35		1,7 $\pm$ 0,8	
DXM 10		141 $\pm$ 50**	90	104 $\pm$ 11**	84	22 $\pm$ 8**	92	1011 $\pm$ 99**	90	170 $\pm$ 12**	90	3,2 $\pm$ 1,5**	92
1		256 $\pm$ 73**	80	136 $\pm$ 4**	79	22 $\pm$ 10**	92	1146 $\pm$ 94**	86	241 $\pm$ 28**	79	3,0 $\pm$ 1,6**	93
SV 100		192 $\pm$ 21**	85	156 $\pm$ 19**	76	34 $\pm$ 4**	59	3446 $\pm$ 574*	18	321 $\pm$ 31**	57	4,7 $\pm$ 1,9**	88
50		418 $\pm$ 34**	66	139 $\pm$ 10**	78	30 $\pm$ 1**	71	3396 $\pm$ 473*	19	395 $\pm$ 50**	47	3,4 $\pm$ 1,9**	79
25		647 $\pm$ 24**	46	202 $\pm$ 17**	68	33 $\pm$ 3**	60	3563 $\pm$ 548	14	459 $\pm$ 50**	39	5,4 $\pm$ 1,2**	63
12,5				241 $\pm$ 23**	62	43 $\pm$ 9*	35			552 $\pm$ 40**	30	7,6 $\pm$ 5,9**	59
6,25				484 $\pm$ 94**	23							15,9 $\pm$ 9,8	50

## IV. RESULTADOS





**Tabla IV.34.** Resumen de las CI<sub>50</sub> ( $\mu$ M) de DMN, SC y SV sobre la producción de citocinas en linfocitos estimulados.

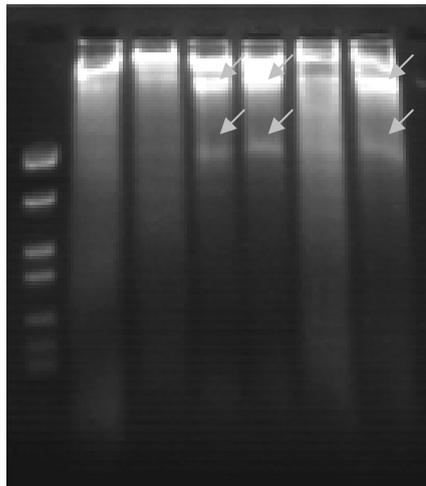
	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
DMN		1,63	2,76	0,66	1,35
SC	45,9	7,52	23,1	28,7	2,77
SV	28,6	15,7	20,4	59,3	12,4

### IV.2.12. Efecto sobre la inducción de apoptosis en linfocitos humanos

▪ **Análisis de la ruptura del ADN o *ladder***

Este ensayo es una prueba cualitativa, en la que vemos *a priori* si nuestro producto induce la apoptosis a las células con las que está en contacto mediante la ruptura del ADN que veremos como bandas o *ladders*. Como se observa en la figura, ni control ni blanco tienen el ADN roto, pero sí se observan bandas en desmetilnobiletina a 25  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  y en cicloheximida a 30  $\mu\text{M}$ . Los iridoides no produjeron ruptura del ADN.

Patrón	+	-	-	-	-	-	-
PHA	-	+	-	+	+	+	+
DMN ( $\mu\text{M}$ )	-	-	-	25	10	5	-
CHX ( $\mu\text{M}$ )	-	-	-	-	-	-	30



**Fig. IV.14.** Bandas de ADN o *ladders* en un gel de agarosa expuesto a luz UV. Efecto de DMN (25, 10 y 5 $\mu\text{M}$ ) en la inducción de apoptosis en linfocitos humanos estimulados con PHA.

**▪ Ensayo de apoptosis Anexina V-FITC**

La flavona no induce a las células sin estimular a la apoptosis, excepto a 25  $\mu\text{M}$ , sin embargo cuando son tratadas se ve un aumento en el número de células apoptóticas, así como de las de transición. Lo mismo ocurre con las células tratadas con cicloheximida.

Por su parte, los iridoides no indujeron apoptosis en las células tratadas con PHA, ni modificaron el estado de aquellas que no fueron estimuladas. Aunque sí se ve un ligero incremento de apoptosis en células no estimuladas tratadas con SC a 100  $\mu\text{M}$ .

**Tabla IV.35.** Efecto de DMN, SC y SV sobre la inducción de apoptosis. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (test de Bonferroni). Tests individuales para células no estimuladas (fondo gris) y estimuladas;  $n = 3$  experimentos individuales

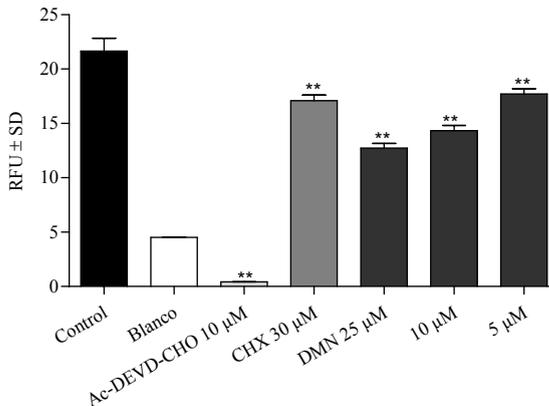
	Células vivas	Células apoptóticas	Células transición	Células necróticas
Control (PHA)	76,27 ± 0,54	16,64 ± 0,62	4,23 ± 0,47	2,86 ± 0,34
Blanco	85,89 ± 0,31	10,75 ± 0,57	1,91 ± 0,24	1,45 ± 0,26
CHX (30 µM)	78,10 ± 0,43***	15,79 ± 0,67***	3,40 ± 0,34***	3,71 ± 0,23***
(30 µM + PHA)	62,79 ± 0,71***	27,63 ± 0,54***	5,71 ± 0,45***	3,87 ± 0,40*
DMN (25 µM)	76,09 ± 0,52***	19,95 ± 0,47***	3,33 ± 0,32**	0,63 ± 0,17
(25 µM + PHA)	72,54 ± 0,73***	22,61 ± 0,56***	3,52 ± 0,40	1,33 ± 0,21***
(10 µM)	84,81 ± 0,67*	11,08 ± 0,70	1,78 ± 0,22	2,33 ± 0,37
(10 µM + PHA)	68,37 ± 0,49***	25,50 ± 0,67***	4,85 ± 0,39	1,28 ± 0,20***
(5 µM + PHA)	71,21 ± 0,55***	22,24 ± 0,54***	5,33 ± 0,61*	1,22 ± 0,15***
SC (100 µM)	79,45 ± 0,45***	16,31 ± 0,57***	3,46 ± 0,50***	0,78 ± 0,25
(100 µM + PHA)	73,89 ± 0,64***	18,96 ± 0,42***	5,83 ± 0,48***	1,32 ± 0,3***
(50 µM + PHA)	72,88 ± 0,49***	19,92 ± 0,44***	5,28 ± 0,41*	1,92 ± 0,38
SV (100 µM)	81,31 ± 0,41***	13,48 ± 0,56***	3,97 ± 0,39***	1,24 ± 0,27
(100 µM + PHA)	75,12 ± 0,60*	17,18 ± 0,71	5,53 ± 0,57**	2,17 ± 0,35
(50 µM + PHA)	75,71 ± 0,31	17,54 ± 0,58	4,17 ± 0,42	2,58 ± 0,49

### ▪ Efecto sobre la actividad caspasa-3

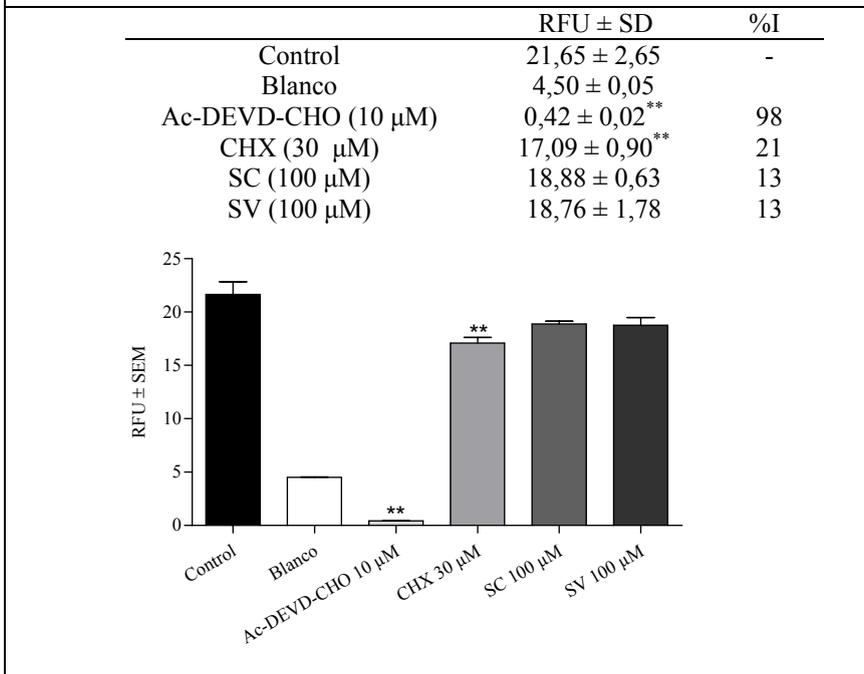
DMN, al igual que la cicloheximida, inhibió la actividad de la caspasa-3, una enzima que interviene en el proceso apoptótico, pero que en células no apoptóticas juega un papel muy importante en la proliferación (Tabla IV.38). Los iridoides no tuvieron un efecto relevante sobre la caspasa-3 (Tabla IV.39).

**Tabla IV.36.** Efecto de DMN sobre actividad caspasa-3. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett);  $n = 3$  experimentos individuales. RFU<sup>†</sup>=Unidades relativas de fluorescencia

	RFU <sup>†</sup> ± SD	%I
Control	21,65 ± 2,65	-
Blanco	4,50 ± 0,05	
Ac-DEVD-CHO (10 μM)	0,42 ± 0,02**	98
CHX (30 μM)	17,09 ± 0,90**	21
DMN (25 μM)	12,74 ± 1,00**	41
(10 μM)	14,32 ± 1,23**	34
(5 μM)	17,71 ± 1,20**	18



**Tabla IV.37.** Efecto de SC y SV sobre actividad caspasa-3. \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (t de Dunnett); n = 3 experimentos individuales



## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos expuestos en esta tesis doctoral demuestran los mecanismos de acción antiinflamatoria, antialérgica y antiproliferativa de los compuestos estudiados. Previamente se habían realizado algunos acerca de las propiedades farmacológicas de la polimetoxiflavona 5-O-desmetilnobiletina (DMN) y los dos iridoides escropoliósido A (SC) y escrovalentinósido (SV), en los cuales se demostraron las propiedades antioxidantes *in vitro* del flavonoide [Mora *et al.*, 1990] y antiinflamatoria *in vivo* de los iridoides [Giner *et al.*, 2000]. En el presente trabajo se ha investigado la actividad antiinflamatoria *in vivo* en otros modelos experimentales, incluyendo protocolos de hipersensibilidad retardada, así como el efecto sobre diferentes mediadores implicados en los procesos inflamatorios.

### 5-O-DESMETILNOBILETINA

Desde un punto de vista químico, DMN es una polimetoxiflavona que carece de grupo catecol en el anillo B. Respecto a su actividad farmacológica *in vivo*, no existen trabajos previos acerca de la actividad antiinflamatoria o antialérgica de este flavonoide o de compuestos relacionados estructuralmente.

La aplicación repetida de TPA en oreja de ratón activa la proteína-quinasa C, que a su vez provoca una respuesta inflamatoria acompañada de hiperplasia y aumento en la expresión de COX-2 [Mukazami *et al.*, 2000]. Los metabolitos que resultan tras la liberación de ácido

araquidónico y la consecuente transformación en leucotrienos y prostaglandinas por la LOX y la COX, respectivamente, están implicados en el proceso inflamatorio desencadenado [Kim *et al.*, 2004]. DMN redujo tanto la inflamación como la infiltración leucocitaria tras la aplicación repetida de TPA. Un modelo clásico en la investigación de fármacos antiinflamatorios inhibidores de COX es el edema inducido por carragenina en la pata de ratón. La inyección subcutánea de este agente irritante origina edema, cuya primera fase es resultado de la liberación de histamina, serotonina y cininas, mientras que en la segunda fase se produce la inducción de la COX-2, con una elevada producción de prostaglandinas, radicales libres oxigenados e infiltración de neutrófilos [Morris, 2003]. DMN administrada *per os* redujo significativamente el edema a las tres horas, cuando la actividad COX es máxima. Además, en los estudios realizados *in vitro* utilizando macrófagos de ratón RAW 264.7 estimulados con LPS, se pudo constatar la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub>. Este efecto se debe probablemente a una acción directa sobre la COX-2, pero también por la moderada inhibición de la expresión de la enzima en las células activadas. Estos hallazgos justificarían en parte la actividad antiinflamatoria de DMN observada *in vivo* en los modelos experimentales citados anteriormente.

DMN también inhibió de modo notable el edema plantar inducido por PLA<sub>2</sub>. Esta enzima es importante en el proceso inflamatorio, ya que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos esterificados en el segundo carbono del glicerol, liberando ácido araquidónico que se encuentra esterificado en esa posición y es metabolizado por COX y/o LOX, originando

metabolitos como prostaglandinas y leucotrienos que están involucrados en la estimulación y posterior desgranulación y motilidad de los neutrófilos, liberando mediadores como histamina y serotonina que son los responsables del edema generado en la pata [Sundell *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004]. La inhibición observada probablemente se deba a que previene la liberación de histamina o serotonina. Esta hipótesis está apoyada en parte en el hecho de que la mayoría de flavonoides inhiben la liberación de histamina a partir de mastocitos humanos [Middleton *et al.*, 2000], aunque en nuestro caso la actividad está fundamentalmente justificada por la alteración del metabolismo del ácido araquidónico.

Los resultados sugieren que el flavonoide actuaría principalmente modificando la vía del metabolismo del ácido araquidónico, bien inhibiendo la actividad de alguna de las enzimas implicadas o bien afectando a la propia enzima. DMN inhibió la producción de LTB<sub>4</sub> en neutrófilos de rata estimulados con ionóforo de calcio por una acción directa de la enzima 5-LOX. Existen numerosos estudios sobre los flavonoides como inhibidores de la actividad LOX, algunos de los cuales se recogen en las revisiones de Middleton *et al.* (2000) y Havsteen (2002), y de ellos se deduce que dicha actividad se debe a sus propiedades quelantes de metales, pero no a su capacidad de prevenir la peroxidación lipídica. Otros compuestos activos descritos son los derivados 3',4'-dihidroxiados, como la 6,7,8-trimetoxi-3',4'-dihidroxi flavona y cirsiolol [Yoshimoto *et al.*, 1983]. DMN tiene una potencia similar al cirsiolol, inhibiendo la 5-LOX en el mismo rango de concentración y es más potente que otros derivados con grupo catecol, lo cual es destacable

puesto que en estudios anteriores de relación estructura química-actividad se llegaba a la conclusión de que compuestos análogos con un grupo catecol mostraban actividad anti-5-LOX, es decir el grupo catecol incrementa o es responsable de la actividad [Yoshimoto *et al.*, 1983; Alcaraz *et al.*, 1987, Ferrándiz *et al.*, 1991]. Sin embargo, esta es la primera vez que un flavonoide con el anillo A sustituido y sin grupo catecol en el B inhibe la actividad 5-LOX.

Aunque en estudios previos se había demostrado que DMN inhibía la peroxidación lipídica no enzimática [Mora *et al.*, 1990] y tenía capacidad de captar radical superóxido en un sistema no enzimático [Huguet *et al.*, 1990], esto ocurría a una concentración que probablemente no se alcance por biodisponibilidad *in vivo*. Además, Nakamura *et al.* (2003) demostraron que cuando aplicaban durante la fase de activación los productos antioxidantes inhibidores de 5-LOX, no se modificaba la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> después de haber aplicado el TPA en las orejas, desechando la hipótesis de un mecanismo de acción antioxidante de los inhibidores de la LOX. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad antiinflamatoria y la reducción de la infiltración leucocitaria son debidas a la capacidad de DMN de inhibir directamente la formación de LTB<sub>4</sub> y no por un mecanismo antioxidante. Otros ejemplos de inhibidores de la 5-LOX son algunas flavanonas como pinocembrina [Sala *et al.*, 2003] o sakuranetina [Hernández, 2003]. Desde un punto de vista estructural, los compuestos inhibidores de la 5-LOX son flavonoles y flavonas preniladas [Chi *et al.*, 2001], sin embargo Rice-Evans (2001) ha sugerido que el clásico mecanismo antioxidante de los

flavonoides no es la única explicación para el efecto de estos compuestos a nivel celular, por lo que sería interesante profundizar en el mecanismo de inhibición de DMN, si se une al sitio activo de la enzima o a un lugar diferente.

La hipersensibilidad por contacto está causada por una respuesta celular inmunitaria hacia un alérgeno, que suele ser un agente químico, y en la que están involucrados los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [Wang *et al.*, 2000]. Para reproducir esta situación experimentalmente se emplean potentes agentes sensibilizantes como oxazolona o DNFB, los cuales incrementan el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en nódulos linfáticos. La oxazolona induce dermatitis por contacto en ratones y produce incremento del espesor del tejido junto con un aumento de los niveles de prostaglandinas y leucotrienos; sin embargo los inhibidores de COX y 5-LOX no afectan a la reacción de DTH inducida por oxazolona [Meurer *et al.*, 1988; Young y De Young, 1989]. Sólo los corticoides e inhibidores de citocinas son capaces de inhibir dicha reacción y la posterior respuesta inflamatoria [Zunic *et al.*, 1998]. Respecto al DNFB, veinticuatro horas después de inducir la reacción de dermatitis por contacto en ratones previamente sensibilizados con este hapteno se aprecia un incremento significativo de la expresión de iNOS en las células de Lagerhans de la epidermis y como consecuencia aumenta la producción de NO [Ross *et al.*, 1998]. Este es uno de los mediadores pro-inflamatorios en la fase de resolución de la hipersensibilidad por contacto inducida por DNFB, y la inhibición de la iNOS suprime la reacción de hipersensibilidad [Szabó *et al.*, 2001]. En el tercer protocolo experimental utilizado, la inyección

subcutánea de SRBC desencadena una reacción mediada por células presentadoras de antígeno de MHC II y células T CD4<sup>+</sup> [Grabbe y Schwarz, 1998]. Dependiendo del procedimiento de inmunización, puede tener lugar diferentes tipos de reacciones como la clásica tuberculínica o bien la reacción retardada de Arthus [Hurtrel *et al.*, 1992].

En los experimentos realizados, la flavona redujo la DTH inducida tanto por oxazolona como por DNFB, pero no tuvo efecto a las 24 h de la reacción de DTH por SRBC, aunque sí inhibió significativamente la respuesta inflamatoria. Delaney *et al.* (2001) publicaron el efecto de una mezcla estandarizada de polimetoxiflavonas, entre las que se encontraba DMN, en ratones inmunizados con SRBC. La mezcla de flavonoides redujo moderadamente la actividad de las células NK, mientras que la inmunidad humoral no se vio afectada por la exposición de los flavonoides, demostrando que la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  afecta a la actividad de las células NK. Se han descrito resultados similares frente a la reacción de DTH inducida por SRBC y DNFB por algunos flavonoides, por ejemplo plantagósido, el cual inhibió la respuesta inmune *in vitro* de esplenocitos de ratón frente a SRBC [Kandaswami, 1993; Middleton *et al.*, 1993]. En general, las diferencias en la actividad de los flavonoides son explicadas por la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> y la pérdida de la hidroxilación. En el caso de las flavonas, la estructura es plana debido a este doble enlace en C<sub>2</sub>, mientras que las flavanonas tienen una disposición tridimensional que les confiere diferentes efectos sobre las enzimas pro-inflamatorias [Middleton *et al.*, 2000]. Aunque clásicamente

se ha considerado la planaridad de la molécula y la presencia de un solo grupo hidroxilo libre desfavorable para la actividad antialérgica, DMN claramente redujo la inflamación a los diferentes tiempos en los experimentos de oxazolona y DNFB, además inhibió la fase inflamatoria en el ensayo del SRBC. Existen estudios en los que se afirma que el LTB<sub>4</sub> está implicado en algunos tipos de reacciones de DTH, principalmente en las de SRBC [Yamada y Sugawara, 1996; Feng *et al.*, 1996]. Estos argumentos deberían explicar, al menos en parte, el efecto de DMN en las reacciones de hipersensibilidad, especialmente la inducida por SRBC.

Diferentes células de la piel, como queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, fibroblastos y células endoteliales, son capaces de sintetizar NO mediante distintas NOS, entre ellas la iNOS [Bruch-Gerharz *et al.*, 1998]. Los corticoides son inhibidores de la expresión de la iNOS y pueden servir como terapia de la dermatitis por contacto, pero la inhibición de la expresión selectiva de la iNOS puede dar lugar a resultados similares eliminando los efectos negativos de los corticoides [Ahluwalia, 1998]. Algunos flavonoides, como kaempferol y apigenina son potentes inhibidores de la inducción de iNOS a nivel de la transcripción del gen y a su vez incrementan la actividad de la NOS endotelial (eNOS) [Olszanecki *et al.*, 2002]. Aunque no existen estudios directos con DMN, sí se ha citado el efecto anti-iNOS de un derivado análogo estructural, nobiletina, el cual incrementa la síntesis *de novo* de IκB inactivando al NF-κB y como consecuencia inhibiendo la expresión de iNOS y COX-2 [Murakami *et al.*, 2003]. En nuestro experimento, DMN inhibió la producción de NO sin modificar la expresión enzimática. Un

comportamiento similar tuvo sobre COX-2, pues no afectó significativamente la expresión de dicho enzima aunque si afectó a su actividad al disminuir la producción de PGE<sub>2</sub> en macrófagos RAW 264.7. También disminuyó la liberación de 12-HHTrE, un metabolito derivado de la actividad COX-1 en plaquetas de rata. Por último, a diferencia de otros flavonoides, DMN no tiene efecto sobre el NF-κB en macrófagos RAW 264.7, lo que reafirma el comportamiento de la flavona sobre las enzimas iNOS y COX-2.

Tras el desencadenamiento de la reacción de hipersensibilidad, los linfocitos CD8<sup>+</sup> producen IFN-γ e IL-2, e inician la reacción de inflamación cutánea durante la fase efectora [Wang *et al.*, 2000]. El aumento de IFN-γ estimula la expresión del MHC I y II y también modula la respuesta inmunitaria mediada por células T [Grassegger y Höpfl, 2004]. Por otro lado, durante el desarrollo de las células T CD4<sup>+</sup> en la periferia, los linfocitos se diferencian en varios tipos de células T cooperadoras caracterizadas por la expresión de distintas citocinas. Así, las células Th1 producen IL-2, IFN-γ y TNF-α, mientras que las células Th2 producen IL-4 y IL-10 [Kimber *et al.*, 2002], siendo por tanto las células T CD8<sup>+</sup> relevantes en la fase de sensibilización, mientras que las CD4<sup>+</sup> limitan la magnitud y la duración de la respuesta [Xu *et al.*, 1997]. Manthey *et al.* (1999) estudiaron el efecto de DMN en la inhibición de la producción de TNF-α en monocitos humanos estimulados con LPS. Este compuesto junto con la 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona fueron los más potentes de todas las metoxiflavonas analizadas, incluida nobiletina. En este estudio se demostró que el grado de metoxilación incrementa el

efecto inhibitorio en la producción de TNF- $\alpha$ , sin embargo, los autores sólo estudiaron el efecto de la heptametoxiflavona en la expresión de los mediadores implicados, demostrando que inhibía la expresión de IL-10, pero no la de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. Debido a que DMN mostró actividad antialérgica en las pruebas de hipersensibilidad, se desarrollaron distintos ensayos con las principales células implicadas en dichos procesos, los linfocitos. En primer lugar se observaron las propiedades antiproliferativas en un rango similar a otros flavonoides [Middelton, 2000; Birt *et al.*, 2001] y la inhibición de la producción de citocinas en linfocitos humanos estimulados con PHA, destacando el efecto sobre la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-4. En linfocitos no estimulados, DMN a la dosis más alta no tuvo efecto sobre la producción de las citocinas estudiadas, a excepción de IL-1 $\beta$  e IL-10, las cuales aumentaron de forma dosis-dependiente. Cuando los linfocitos son estimulados con PHA, únicamente se pudo observar una reducción en la producción de IL-1 $\beta$  a la dosis de 2,5  $\mu$ M, sin embargo el aumento de producción de IL-10 estuvo claramente potenciado. En la literatura consultada se han podido encontrar referencias de productos como ciertos bifosfonatos o estatinas que tienen un efecto similar, aumentando la producción de IL-1 $\beta$ , aunque sin afectar a otros como IL-10 e IL-18. Las hipótesis que pueden justificar este comportamiento son varias, la más consistente es la activación de la enzima responsable de la producción de IL-1 $\beta$ , la caspasa-1, pero se ha demostrado que hay otras caspasas que pueden participar en la síntesis de dicha citocina [Miwa *et al.*, 1998]. Otra posibilidad es que DMN afecte de algún modo la prenilación de

proteínas aumentando la producción de IL-1 $\beta$  como observó Luckman *et al.*, (1998) estudiando el mecanismo de acción de bifosfonatos. Por último, los flavonoides en general son potentes inhibidores de la actividad tirosin-cinasa [Middleton, 2000], cuyo papel es crucial en la expresión de la IL-1 $\beta$  inducida por la PKC en linfocitos [Palkama *et al.*, 1993], si bien este extremo no lo hemos estudiado.

En la respuesta inmune, la IL-1 $\beta$  actúa sobre distintas células como macrófagos y monocitos promoviendo la liberación de otras citocinas proinflamatorias. Dicha citocina es un factor activador de linfocitos T, promoviendo su proliferación tras su exposición a antígenos o lectinas, e induce la expresión de IL-2 e IL-2R. En un ensayo con ratones sensibilizados con SRBC a los que además se les administró IL-1 $\beta$  Nakae *et al.* (2001a) observaron un aumento de producción de anticuerpos, demostrando que la IL-1 $\beta$  está implicada en la activación de linfocitos T en la respuesta primaria mediante la interacción con las APCs. Ya que la IL-1 $\beta$  es necesaria para la unión específica del linfocito T con el antígeno y la inducción de los linfocitos T de memoria, en ausencia de IL-1 las células T de memoria se desarrollarían de una forma pobre después de la primera exposición al antígeno, motivo por el cual Nakae *et al.* (2001a; 2001b) sugieren que la producción de citocinas tanto por Th1 como Th2 se ve reducida tras la segunda exposición al antígeno en ratones deficientes en IL-1 y que la IL-1 $\beta$  es un potente activador de la respuesta humoral. DMN incrementa la producción de IL-1 $\beta$ , por lo que parece lógico que en SRBC no mostrara efecto en la primera fase como antialérgico y sí lo mostrara en la segunda fase como antiinflamatorio

inhibiendo los metabolitos lipídicos derivados de la vía del ácido araquidónico. Sí que se ve efecto en los otros modelos de hipersensibilidad por contacto porque posiblemente DMN actúe desplazando el balance Th1/Th2 hacia los linfocitos Th2, como se desprende de los resultados obtenidos en la liberación de citocinas. Es decir, DMN permitiría la proliferación de linfocitos T cooperadores de tipo 2 que actúan reduciendo la actividad de los linfocitos T citotóxicos, además de favorecer una respuesta de tipo humoral.

Las reacciones inflamatorias van acompañadas de un incremento en la permeabilidad vascular que puede ser mediada por numerosos factores, incluyendo histamina, serotonina, PGE<sub>2</sub>, el factor activador de plaquetas, la sustancia P, IL-8 y TNF- $\alpha$ . Li *et al.* (1994) demostraron que la IL-10 inhibía la extravasación vascular afectando directamente las células endoteliales al inhibir la liberación de uno o más de los mediadores vasoactivos. Esta citocina con actividad antiinflamatoria, disminuye la expresión de IL-2, IL-18 e IFN- $\gamma$  producidas por linfocitos Th1 e induce la expresión de las citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ ) tanto en células CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, así como en linfocitos B [Xu *et al.*, 2004]. Estos resultados indican que la IL-10 desplazaría el balance Th1/Th2 hacia respuestas de tipo Th2 mediante la inhibición de la producción de las citocinas tipo Th1 y aumento de las de tipo Th2 en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Aunque diferentes citocinas pueden inhibir distintos tipos de DTH, como máximo pueden reducir la mitad del edema de la pata, lo cual es explicado por las múltiples vías interreguladas durante la DTH, como por ejemplo la inhibición de producción de IL-6 e IL-10 por la propia IL-

10 [Li *et al.*, 1994]. En un estudio recogido por Ferguson *et al.* (1994) se alude a la capacidad de IL-10 para inhibir la función de las células de Langerhans como células presentadoras de antígeno para los linfocitos Th1, pero no para los Th2. En conjunto, estos resultados justifican en parte los efectos observados para DMN en los experimentos *in vivo* de DTH realizados en la presente tesis doctoral.

Daskiewicz *et al.* (2005) estudiaron la relación estructura-actividad de diversos flavonoides, componentes habituales de la dieta humana, sobre la proliferación de la línea celular de colon HT29. En resumen, las flavonas y flavonoles poseen mayor actividad antiproliferativa que chalconas y flavanonas, destacando quercetina y kaempferol, mientras que las flavonas polimetoxiladas no presentan actividad. La mayoría de los compuestos que mostraban esta actividad, reducían la viabilidad celular a menos del 60% durante las 6 primeras horas y originaban un aumento de la actividad caspasa, atribuyendo en parte su actividad antiproliferativa a una respuesta apoptótica. En un estudio previo complementario, Verbeeck *et al.* (2004) observaron que el doble enlace entre los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> otorgaba mayor actividad a los compuestos, mientras que un grupo hidroxilo en el C<sub>3</sub> la disminuía, siendo por tanto más activas las flavonas que los flavonoles. En nuestro caso, DMN inhibió la proliferación celular en linfocitos humanos estimulados con PHA sin reducir su viabilidad. Mediante técnicas de citometría de flujo se pudo comprobar que el tratamiento de las células con DMN previamente a la estimulación con PHA no afecta a la progresión del ciclo celular en las 24 horas siguientes. Sin embargo, transcurridas 72 h,

DMN claramente detuvo la progresión del ciclo en la fase  $G_0/G_1$ . En el ensayo que se efectuó a distintos tiempos se observó que tratando las células con DMN con anterioridad a las 24 h desde la estimulación con PHA la mayoría de las células permanecieron en la fase  $G_0/G_1$ , con un ligero incremento en la fase sub $G_0$  (apoptosis), disminuyendo su actividad al adicionar DMN trascurridas 48 h. Al igual que artelastina, una flavona prenilada [Cerqueira *et al.*, 2003], DMN afecta preferentemente la fase inicial de la reacción, lo cual confirma que su efecto debe estar relacionado con la inhibición de eventos bioquímicos como la progresión del ciclo celular o expresión de genes de ciclinas o ARNm de citocinas necesarias para la proliferación inducida por PHA como IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  [Liu *et al.*, 2004].

Coincidiendo con otros flavonoides [Middleton, 2000], DMN tuvo un efecto apoptótico moderado, ya que a 10  $\mu\text{M}$  DMN no induce apoptosis en linfocitos no estimulados, sin embargo a 25  $\mu\text{M}$  se observó un leve efecto apoptótico. Finalmente se estudió en linfocitos no apoptóticos el efecto de DMN sobre la actividad de la caspasa-3, enzima pro-apoptótica implicada en la proliferación celular. Al tratar los linfocitos con el agente mitógeno aumentó la actividad de la enzima, mientras que las células no estimuladas con PHA mantuvieron baja la actividad, lo cual demuestra que la actividad caspasa-3 está incrementada en los linfocitos no apoptóticos y que están proliferando [Alam *et al.*, 1999; Lakhani *et al.*, 2003; Krakauer, 2004; Schwerk *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004]. Ejemplo de ello son los estudios llevados a cabo con mesilato de imantinib [Dietz *et al.*, 2004] y con inhibidores generales

de caspasas [Kennedy *et al.*, 1999; Falk *et al.* 2004] donde el compuesto inhibe la proliferación linfocitaria, el ciclo celular, la fosforilación del ERK 1/2, la activación del NF- $\kappa$ B y la actividad caspasa-3, sin inducir apoptosis. En el caso de los inhibidores generales de caspasas se inhibe la producción de IL-2, citocina que promueve la entrada de las células T en la fase S del ciclo celular, sugiriendo que en células T humanas las funciones no apoptóticas están involucradas en la activación de ciertos factores de transcripción necesarios para la inducción del sistema IL-2/IL-2R. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto mediante el cual las caspasas desempeñan su función no apoptótica sigue sin conocerse.

Todos los datos experimentales obtenidos con DMN justifican el efecto antiinflamatorio y antialérgico en caso de reacciones de hipersensibilidad, como ha sido la reducción de mediadores directamente implicados como PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, NO, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y la proliferación linfocitaria, causa directa de los fenómenos de hipersensibilidad.

## ESCROPOLIÓSIDO A Y ESCROVALENTINÓSIDO

Escropoliósido A (SC) y escrovalentinósido (SV) son iridoides glicosilados y acilados derivados del catalpol de los cuales existe una referencia previa de sus propiedades antiinflamatorias [Giner *et al.*, 2000]. Cuando se ensayaron en modelos de hipersensibilidad retardada, ambos compuestos presentaron actividad, sin embargo se manifestaron claras diferencias en el comportamiento antiinflamatorio, razón por la cual se planteó un estudio específico de actividad frente a diversos protocolos de DTH, modificando las condiciones experimentales y estudiando el efecto sobre los diferentes mediadores. Tanto SC como SV inhibieron la fase inflamatoria de la reacción de hipersensibilidad inducida por oxazolona y SRBC, pero no tuvieron efecto en la reacción inducida por DNFB.

Para el completo desarrollo de la reacción de hipersensibilidad se requieren tanto linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los T CD8<sup>+</sup> [Wang *et al.*, 2000]. Durante el desarrollo de la inflamación cutánea durante la fase de resolución, la hipersensibilidad por contacto es iniciada por el reclutamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la epidermis de la piel reexpuesta al alérgeno y la inducción de apoptosis de queratinocitos, mientras que la infiltración de las células T CD4<sup>+</sup> que regulan la magnitud de la respuesta, tiene lugar horas más tarde, cuando la reacción comienza a remitir [Akiba *et al.*, 2002]. Estos datos sugieren que los iridoides ejercen mayor efecto sobre las células T CD4<sup>+</sup> que sobre las T CD8<sup>+</sup>, ya que en la reacción de hipersensibilidad los mejores resultados se obtuvieron en la respuesta inflamatoria. En la reacción inducida por SRBC, SV también tuvo efecto en la resolución.

El iridoide SC redujo la liberación de NO así como la inducción de la NOS, mientras que SV tan solo tuvo efecto en la liberación de NO. Este fenómeno está relacionado con la inhibición del NF- $\kappa$ B ya que este factor de transcripción está implicado en la inducción de la NOS, además de la formación de otros mediadores peptídicos. Koo *et al.* (2004) dieron a conocer el efecto del iridoide genipina en diferentes modelos experimentales de inflamación y demostraron que su actividad antiinflamatoria era debida a la disminución de la producción de NO por inactivación del NF- $\kappa$ B. En nuestro caso sólo SC afectó a este factor, lo cual explica la reducción de la inducción de NOS y COX-2 por este compuesto, sin embargo SV en las mismas condiciones experimentales es inactivo. Es decir, que la diferencia estructural en las posiciones de los grupos acetilo y *trans-p*-metoxi-cinamoilo en estos compuestos modifica la acción farmacológica.

Como se comentó anteriormente, la aplicación de oxazolona incrementa los niveles de metabolitos del ácido araquidónico en los tejidos, incluyendo PGs y LTs, pero los inhibidores selectivos de COX y 5-LOX no reducen la inflamación, incluso cuando son administrados conjuntamente, y únicamente los corticoides e inhibidores de citocinas inhiben la reacción [Meurer *et al.*, 1988]. SC redujo la producción de LTB<sub>4</sub> en neutrófilos peritoneales de rata e inhibió la expresión de COX-2 en macrófagos RAW 264.7, aunque sin actuar significativamente sobre la producción de PGE<sub>2</sub>. No es abundante la literatura en la que se destaque el efecto antiinflamatorio de los iridoideos. An *et al.* (2002) describieron que catalpósido, un compuesto con una estructura muy similar a SC y SV

inhibía la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Además inhibió la expresión de esas citocinas al impedir la translocación al núcleo la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B. Estos resultados concuerdan con el efecto de nuestros iridoides en los modelos experimentales de inflamación *in vivo* así como los ensayos *in vitro* realizados, probablemente debido a que los compuestos comparten el mismo esqueleto o catalpol. En nuestro caso también se ha demostrado el efecto de SC y SV sobre los mediadores implicados en las reacciones de hipersensibilidad retardada. Ambos iridoides disminuyen la producción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos humanos con diferentes potencias, siendo IFN- $\gamma$  la citocina más sensible, sin embargo ninguno de los compuestos afectó a la liberación de IL-10. Las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  tienen un efecto estimulador en el endotelio, atrayendo leucocitos a la zona y aumentando la expresión de moléculas de superficie en las células residentes durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria de la hipersensibilidad de contacto. La IL-2, junto con la IL-1 $\beta$ , promueven la proliferación de linfocitos T y su diferenciación [Hou *et al.*, 2006]; estas células son cruciales en la respuesta a agentes alérgicos [Wang *et al.*, 2000]. Por su parte, IL-4 es la citocina predominante en la hipersensibilidad por contacto, mientras que IFN- $\gamma$  es expresada en diferentes reacciones de hipersensibilidad [Grabbe y Schwarz, 1998]. IL-4 juega un papel importante en el desarrollo de las células Th2, donde es de destacar que ambos iridoides fueron activos con una potencia muy similar, sin embargo IFN- $\gamma$  e IL-12 promueven la diferenciación de células Th1. La producción de distintas citocinas es determinante para

caracterizar la respuesta inmune en diferentes patologías, incluyendo enfermedades infecciosas y respuestas autoinmunes y alérgicas, en las cuales la relación Th1/Th2 está alterada [Wang *et al.*, 2000]. La diferente potencia entre los iridoides como inhibidores de las distintas citocinas nos podría proporcionar una explicación de las diferentes respuestas mostradas en las pruebas *in vivo*, donde el descenso de la producción de estos mediadores reduce la respuesta frente a la hipersensibilidad retardada inducida por SRBC.

El paso principal en la generación de una respuesta inmune es la activación y expansión de células T, las cuales permanecen normalmente en la fase  $G_0$  hasta que la estimulación con antígenos específicos o agentes mitógenos inducen la entrada en el ciclo celular. En esta fase, IL-2 juega un papel muy importante, ya que la transición de  $G_0$  a  $G_1$  viene marcada por la activación transcripcional del receptor de la IL-2 y de los genes correspondientes. Los siguientes sucesos de la fase  $G_1$  y el inicio de la síntesis de ADN dependen de la inducción del receptor de IL-2 y de una aportación autocrina o externa de IL-2. Una vez interrumpida la progresión del ciclo celular, es necesaria la presencia de IL-2 para reestablecerlo, promovida su liberación por IL-4 e IFN- $\gamma$  [Kuo *et al.*, 2000]. La producción de IL-2 fue inhibida significativamente por ambos iridoides, así como la liberación de IFN- $\gamma$  e IL-4, modificando consecuentemente la progresión del ciclo celular al disminuir el paso de células entre las fase S y la M. La inhibición de la linfoproliferación por los iridoides no es debida a la inducción de apoptosis, como se comprobó

en diferentes pruebas específicas, por lo que se puede deducir que la inhibición de la producción de citocinas es la principal vía implicada.

Algunos estudios previos con compuestos análogos establecieron propiedades immunoestimulantes *in vitro* en distintos iridoides, entre ellos escropoliósido A [Garg *et al.*, 1994], y nuestros estudios han demostrado que este compuesto claramente reduce la respuesta inflamatoria en reacciones de hipersensibilidad retardada. Algunas diferencias en las respuestas farmacológicas pueden ser justificadas en parte por las características químicas de los iridoides, como la presencia al menos de una glucosa en la molécula, que puede condicionar la respuesta farmacológica. De hecho, los iridoides glicosilados son inestables en medio acuoso porque se hidroliza la molécula de glucosa y en nuestro caso, para obtener la máxima actividad se trataron las células con los compuestos al menos 3 h antes de estimularlas. Esta hipótesis está comprobada experimentalmente con los resultados obtenidos con aucubina, ya que cuando se hidroliza la molécula, ésta inhibe la producción del TNF- $\alpha$ , mientras que la molécula no hidrolizada es inactiva [Park y Chang, 2004], hecho que pone de manifiesto las diferentes respuestas en los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

El conjunto de resultados obtenidos explican el efecto de SC y SV como agentes antiinflamatorios en reacciones de hipersensibilidad retardada, reduciendo la expresión de enzimas pro-inflamatorias como la iNOS y COX-2 mediante la inhibición del NF- $\kappa$ B en el caso de SC, y las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  y especialmente IFN- $\gamma$  en ambos casos.

## VI. CONCLUSIONES

1. La actividad antiinflamatoria *in vivo* de 5-*O*-desmetilnobiletina se debe tanto a su efecto sobre el metabolismo del ácido araquidónico, al disminuir la producción de LTB<sub>4</sub> por inhibición directa de la 5-lipoxigenasa, como a la inhibición de diferentes citocinas, especialmente interleucina-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  e incremento de la citocina antiinflamatoria interleucina-10.
2. El efecto antiproliferativo de 5-*O*-desmetilnobiletina responde a un mecanismo de acción específico, afectando principalmente a la evolución del ciclo celular de los linfocitos T, deteniéndolo en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. El efecto está mediado principalmente por la inhibición de la producción de interleucina-2.
3. A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que 5-*O*-desmetilnobiletina tiene propiedades antiinflamatorias en procesos mediados por hipersensibilidad retardada, reduciendo la reacción inflamatoria y la proliferación linfocitaria, lo que podría permitir su empleo como fármaco, ya que aunque su potencia sea inferior a la de compuestos conocidos, su inocuidad *in vivo* avalada por su ingestión frecuente como citroflavonoide, permite incrementar su dosis e incluso emplearlo como complemento preventivo junto a otros derivados estructuralmente relacionados.
4. Escropoliósido A y escrovalentinósido poseen propiedades antiinflamatorias frente a reacciones de hipersensibilidad retardada, inhibiendo la proliferación linfocitaria y la liberación de interleucina-

## VI. CONCLUSIONES

---

- 1 $\beta$ , interleucina-2, interleucina-4, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , y especialmente interferón- $\gamma$ .
5. Escropoliósido A inhibe la activación del NF- $\kappa$ B, lo que justifica la inhibición de la expresión de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible y ciclooxigenasa-2. En el caso de escrovalentinósido dicho factor de transcripción no está directamente implicado, si bien también disminuye la actividad de las mencionadas enzimas proinflamatorias.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología Molecular y Celular* (4<sup>a</sup> ed.), McGraw-Hill · Interamericana: Madrid, **2002**
- Ahluwalia A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediat Inflamm*, **1998**; 7: 183-193
- Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease. *Curr Op Immunol*, **2004**; 16: 717-723
- Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, Kaneko F, Nicolas JF. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol*, **2002**; 168: 3079-3087
- Alam A, Cohen L, Aouad S, Sékaly R. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in non apoptotic cells. *J Exp Med*, **1999**; 20: 1879-1890
- Alcaraz MJ, Ferrándiz ML. Modification of the arachidonic metabolism by flavonoids. *J Ethnopharmacol*, **1987**; 21: 209-229
- An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh H, Kwon TO, Song CE, Chung HT. Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 productions and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol*, **2002**; 2: 1173-1181
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors. *Pharmacol Rev*, **1998**; 50: 305-313

- Askenase PW. Yes T cell, but three different T cells ( $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  and NK T cells), and also B-1 cells mediate contact sensitivity. *Clin Exp Immunol*, **2001**; 125: 345-350
- Atish P, Vikrantsinh G, Kamlesh B. Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products. *Drug Disc Today*, **2006**; 11: 725-732
- Baghdikian B, Lanhers MC, Fleurentin J, Ollivier E, Maillard C, Balansard G, Mortier F. An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*, *Planta Med*, **1997**; 63: 171-176
- Barnes PJ. New directions in allergic diseases: Mechanism-based anti-inflammatory therapies. *J Allergy Clin Immunol*, **2000**; 106: 5-16
- Barret AJ. Leukocyte elastase. *Methods Enzymol*, **1981**; 80: 581-588
- Basketter DA. Chemistry of contact allergens and irritants. *Am J Contact Dermatol*, **1998**; 9: 119-124
- Belsito DV. The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol*, **2000**; 105: 409-420
- Bermejo P, Díaz AM, Silván AM, De Santos J, Fernández L, Sanz A, Abad MJ. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med*, **2000**; 66: 324-328
- Biere A, Marak HB, Van Damme JM. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs?. *Oecologia*, **2004**; 140: 430-441
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, **2001**; 90: 157-177

- Bito T, Roy S, Sen CK, Shirakawa T, Gotoh A, Ueda M, Packer L. Flavonoids differentially regulate IFN gamma-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Lett*, **2002**; 520: 154-152
- Bowers MD. Hostplant suitability and defensive chemistry of the *Catalpa sphinx*, *Ceratomia catalpae*. *J Chem Ecol*, **2003**; 29: 2359-2367
- Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *J Pharm Pharmacol*, **2002**; 54: 453-472
- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, **2000**; 7: 427-448.
- Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol*, **1998**; 110: 1-7
- Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica y Plantas medicinales. (2ª ed.) Acribia: Madrid, **2000**
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, **2004**; 70: 93-103
- Celada A. Inmunología Básica. Labor: Barcelona, **1994**
- Cerqueira F, Cordeiro Da Silva A, Araújo N, Cidade H, Kijjoa A, Nascimento M. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: Artelastin as a potent inhibitor. *Life Sci*, **2003**; 73: 2321-2334
- Chang H, Min S, Hyeun C, Yeon C, Haeil P, Hyun K. Inhibition of prostaglandin production by structurally-optimized flavonoid derivative, 2',4',7-trimethoxyflavone and cellular action mechanism. *Biol Pharm Bull*, **2005**; 8: 1366-1370

- Chang IM. Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **1998**; 102: 189-204
- Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukaemia cells. *Biochem Pharmacol*, **2005**; 69: 1421-1432.
- Chen KH, Weng MS, Lin JK. Tangeretin suppresses IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, **2007**; 73: 215-227
- Chen Y, Yang L, Lee TJ. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol*, **2000**; 59: 1445-1457
- Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem Pharmacol*, **2001**; 62: 1185-1191
- Choi JS, Choi YJ, Park SH, Kang JS, Kang YH. Flavones mitigate tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- $\kappa$ B. *J Nutr*, **2004**; 134: 1013-1019
- Clement L, Dagg M, Lehmeier J, Kiyotaki M. Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations inhibit the induction of B cell differentiation by phytohemagglutinin. *J Immunol*, **1983**; 131: 1214-1217
- Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Eur J Immunol*, **2005**; 35:584-592

- Creagh E, Conroy H, Martin S. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, **2003**; 193: 10-21
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Máñez S, Ríos JL. Effect of the basidiomycete *Poria cocos* on experimental dermatitis and other inflammatory conditions. *Chem Pharm Bull*, **1997**; 45: 492-494
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *APMIS*, **2003**; 111: 797-804
- Daskiewicz JB, Depeint F, Viornerly L, Bayet C, Comte-Sarrazin G, Comte Gilles, Gee JM, Johnson IT, Ndjoko K, Hostettmann K, Barron D. Effects of flavonoids on cell proliferation and caspase activation in a human colonic cell line HT29: an SAR study. *J Med Chem*, **2005**; 48: 2790-2804
- De León EJ, Alcaraz MJ, Domínguez JN, Charris J, Terencio MC. 1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivate with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Inflamm Res*, **2003**; 52: 246-257
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, **1989**; 26: 335-341
- Dearman RJ, Moussavi A, Kemeny DM, Kimber I. Contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets to the cytokine secretion patterns induced in mice during sensitization to contact and respiratory chemical allergens. *Immunology*, **1996**; 89: 502-510
- Deep G, Singh RP, Agarwal C, Kroll DJ, Agarwal R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene*, **2006**; 25: 1053-1069

- Del Río JA, Gómez P, Baidez AG, Arcas MC, Botia JM, Ortuño A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *J Agric Food Chem*, **2004**; 52: 1913-1917
- Delaney B, Phillips K, Buswell D, Mowry B, Nickels D, Cox D, Wang H-B. Immunotoxicity of a standardized citrus polymethoxylated flavone extract. *Food Chem Toxicol*, 2001; 39: 1087-1094
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Caspasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, **1999**; 65: 337-353
- Dietz A, Souan L, Knutson G, Bulur P, Litzow M, Vuk-Pavlovic S. Imantinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood*, **2004**; 104: 1094-1099
- Falk M, Ussat S, Reiling N, Wesch D, Kabelitz D, Adam Klages S. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol*, **2004**; 173: 5077-5085
- Felsted R, Leavitt R, Chen C, Bachur N, Dale R. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochem Biophys Acta*, **1981**; 668: 132-140
- Feng Z, Godfrey HP, Mandy S, Strudwick S, Lin KT, Heilman E, Wong PY. Leukotriene B<sub>4</sub> modulates in vivo expression of delayed-type hypersensitivity by a receptor-mediated mechanism: regulation by lipoxin A<sub>4</sub>. *J Pharmacol Exp Ther*, **1996**; 278: 950-956
- Ferguson TA, Dube P, Griffith TS. Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med*, **1994**; 179: 1597-1604
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, **1991**; 32: 283-288

- Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, a dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, **1997**; 57: 2916-2921
- Frohne D, Jensen U. Systematik des Pflanzenreichs. 5 ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, **1998**, pag. 172 y 275
- Fuchs J, Zollner TM, Kaufmann R, Podda M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic Biol Med*, **2001**; 4: 337-353
- Fujisawa H, Kondo S, Wang B, Shivjim M, Sauder DN. The role of CD4 molecules in the induction phase of contact hypersensitivity cytokine profiles in the skin and lymph nodes. *Immunology*, **1996**; 89: 250-255
- Gafner S, Bergeron C, Batcha LL, Reich J, Arnason JT, Burdette JE, Pezzuto JM, Angerhofer CK. Inhibition of [3H]-LSD binding to 5-HT7 receptors by flavonoids from *Scutellaria lateriflora*. *J Nat Prod*, **2003**; 66: 535-537
- Galati G, O'Brien PJ. Potencial toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*, **2004**; 37: 287-303
- Garg HS, Bhandari SPS, Tripathi SC, Patnaik GK, Puri A, Saxena R, Saxena RP. Antihepatotoxic and immunostimulant properties of iridoid glycosides of *Scrophularia koelzii*. *Phytother Res*, **1994**; 8: 224-228
- Ghisalberti EL. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, **1998**; 2: 147-163
- Giner RM, Sanz MJ, Ferrándiz ML, Recio MC, Terencio MC, Ríos JL. Topical anti-inflammatory activity of some iridoids and phenylpropanoids. *Planta Med*, **1991**; 57: (S2) A53

- Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Máñez S, Gray A, Ríos JL. A new iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *pseudoauriculata*. *J Nat Prod*, **1998**; 9: 1162-1163
- Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Máñez S, Cerda-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *Eur J Pharmacol*, **2000**; 389: 243-252
- Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner RM, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol*, **2001**; 428: 137-143
- Góngora L, Máñez S, Giner RM, Recio MC, Ríos JL. On the activity of trifluoperazine and palmitoylcarnitine in mice: delayed hypersensitivity models. *Life Sci*, **2000**; 66: 183-188
- Gorbachev AV, Fairchild RL. Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit Rev Immunol*, **2003**; 21: 452-472
- Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today*, **1998**; 19, 37-44
- Grassegger A, Höpfl R. Significance of the cytokine interferon gamma in clinical dermatology. *Clin Exp Dermatol*, **2004**; 29: 584-588
- Guermónprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **2002**; 20: 621-667
- Hamelryck T, Dao Thi M, Poormans F, Chrispeels M, Wyns L, Loris R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem*, **1996**; 271: 20479-20485

- Haraldsdóttir S, Gudlaugsdóttir E, Ingólfssdóttir K, Ögmundsdóttir HM. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Med*, **2004**; 70: 1098-1100
- Harborne JB. The Flavonoids. Advances in Research since 1980. Chapman and Hall: London, **1988**, pag.233-302
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2002**; 55: 481-504
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, **2002**; 96: 67-202
- Hernández V. Acción antiinflamatoria de sesquiterpenos y flavonoides de *Inula viscosa* e influencia sobre la liberación de mediadores. Tesis doctoral, Universitat de València, **2003**
- Horwat DR, Martínez SG, Cuellar CA, Giuliani A, Palazzo MJC. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol*, **2002**; 82: 127-130
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K, Nagata K. Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids. *Mol Cell Biol*, **1992**; 12: 3490-3498
- Hou LF, Dai Y, Xial YF, Gong ZN. Alleviation of picryl chloride induced delayed type hypersensitivity reaction by saponin fraction of *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull*, **2006**; 29: 1056-1059
- Hoult JRS, Moroney MA, Payá M. Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol*, **1994**; 234: 443-454
- Huguet AI, Máñez S, Alcaraz MJ. Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. *Z Naturforsch*, **1990**; 45c: 19-24

- Hurtrel B, Maire MA, Hurtrel M, Lagrange PH. Different time course patterns of local expression of delayed type hypersensitivity to sheep red-blood-cells in mice. *Cell Immunol*, **1992**; 142: 252-263
- Ishiwa J, Sato T, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. *J Rheumatol*, **2000**; 27: 20-25
- Jiang B, Liu JH, Bao YM, An LJ. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Toxicol*, **2004**; 43: 53-59
- Jinsart W, Ternai B, Polya GM. Inhibition of rat liver cyclic AMP-dependent protein kinase by flavonoids. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **1992**; 373: 205-211
- Ju HK, Moon TC, Lee E, Baek SH, An RB, Bae k, Son KH, Kim HP, Kang SS, Lee SH, Son JK, Chang HW. Inhibitory effects of a new iridoid, patridoid II and its isomers on nitric oxide and TNF- $\alpha$  production in cultured murine macrophages. *Planta Med*, **2003a**; 69: 950-953
- Ju HK, Baek SH, An RB, Bae k, Son KH, Kim HP, Kang SS, Lee SH, Son JK, Chang HW. Inhibitory effects of nardostachin on nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, and TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide activated macrophages. *Biol Pharm Bull*, **2003b**; 26: 1375-1378
- Kalish RS, Askenase PW. Molecular mechanisms of CD8+T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*, **1999**; 103: 192-198
- Kanno S, Shouji A, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, Obara Y, Nakahata N, Ishikawa M. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*, **2006**; 78: 673-681

- Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton EJR. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma *in vitro*. *Cancer Lett*, **1991**; 56: 147-152
- Kawaii S, Tomono Y, Ketase E, Ogawa K, Yano M. Anti-proliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*, **1999**; 63: 896-899
- Kawashima T, Kawasaki H, Kitamura Y, Morimoto O. Interleukin-12 induces tyrosine phosphorylation of an 85-kDA protein associated with the interleukin-12 receptor  $\beta 1$  subunit. *Cell Immunol*, **1998**; 186: 39-44
- Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kägi, Kaiserlian D, Nicoles JF. Cytotoxicity is mandatory for CD8<sup>+</sup> T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med*, **1999**; 189: 779-786
- Kennedy N, Kataoka T, Tschopp J. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med*, **1999**; 20: 1891-1895
- Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang Hw, Kim Js, Kang SS, Kim HP. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and *in vivo* inflammatory response. *Arch Pharm Res*, **2002**; 25: 329-335
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*, **2004**; 96: 229-245
- Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B signalling and gene expression by blocking I $\kappa$ B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology*, **2005**; 115: 375-387
- Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol*, **2002**; 2: 201-211

- Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*, **2002**; 46: 1-5
- Kimber I, Pichowski JS, Basketter DA, Dearman RJ. Immune responses to contact allergens: novel approaches to hazard evaluation. *Toxicol Let*, **1999**; 106: 237-246
- Ko CH, Shen SC, Hsu CS, Chen YC. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem Pharmacol*, **2005**; 69: 913-927
- Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, Kim BC, Jin C, Lim CJ, Parl EH. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 495: 201-208
- Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep*, **2005**; 57: 390-394
- Krakauer T. Caspase inhibitors attenuate superantigen-induced inflammatory cytokines, chemokines, and T-cell proliferation. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2004**; 11: 621-624
- Kuo YC, Weng SC, Chou CJ, Chang TT, Tsai WJ. Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae*. *Br J Pharmacol*, **2003**; 140: 895-906
- Lakhani S, Flavell R. Caspases and T lymphocytes: a flip of the coin?. *Immunol Rev*, **2003**; 193: 22-30
- Lambert DJ, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, **2005**; 81:248-291 S

- Lanthers MC, Fleurentin J, Mortier F, Vinche A, Younos C. Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Med*, **1992**; 58: 117-123
- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, **1991**; 42: 1673-1681
- Lavagno L, Gunella G, Bardelli C, Spina S, Fresu L G, Viano I, Brunelleschi S. Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor- $\alpha$  production from monocytes: role of transcription factor NF- $\kappa$ B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur J Pharmacol*, **2004**; 501: 199-208
- Lebrec H, Kerdine S, Gaspard I, Pallardy M. Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> responses to drugs. *Toxicology*, **2001**; 158: 25-29
- Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase. Physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, **2001**; 164: 896-904
- Lee WR, Shen SC, Lin HY, Houd WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol*, **2002**; 63: 225-236
- Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomed Pharmacother*, **2002**; 56: 296-301
- Li DQ, Bao YM, Zhao JJ, Liu CP, An Lj. Neuroprotective proprieties of catalpol in transient global cerebral ischemia in gerbils: dose-response, therapeutic time-window and long-term efficacy. *Brain Res*, **2004**; 1029: 179-185

- Li L, Elliott JF, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed type hypersensitivity. *J Immunol*, **1994**; 153: 3967- 3978
- Lin JK, Chen YC, Huang YT, Lin- Shiau SY. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem (Suppl)*, **1997**; 28/29: 39-48
- Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol*, **2003**; 27: 2065-2071
- Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC. The extracts from *Nelumbo nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci*, **2004**; 75: 699-716
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*, **1998**; 4: 581-589
- Mack A, Häcker G. Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells. *Eur J Immunol*, **2002**; 32: 1986-1992
- Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthey CL. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human monocytes. *J Nat Prod*, **1999**; 62: 441-444
- Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J Agric Food Chem*, **2002**; 50: 5837-5843

- Mantle D, Gok MA, Lennard TW. Adverse and beneficial effects of plants extracts on skin and skin disorders. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, **2001**; 20: 89-103
- Martin BG. Contact dermatitis: evaluation and treatment. *J Am Osteopath Assoc*, **1999**; 99: S11-S14
- Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull*, **2005**; 28: 253-259
- Mehrotra R, Rawat S, Kulshreshtha DK, Patnaik GK, Dhawan BN. *In vitro* studies on the effect of certain products against hepatitis B virus. *Indian J Med Res*, **1990**; 92: 133-138
- Meurer R, Opas EE, Humes JL. Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on inflammation associated with oxazolone-induced delayed hypersensitivity. *Biochem Pharmacol*, **1988**; 37: 3511-3514
- Middleton E JR, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, **2000**; 59: 673-751
- Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T. Caspase 1-independent IL-1 $\beta$  release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med*, **1998**; 4: 1287-1292
- Miyaichi Y, Hanamitsu E, Kizu H, Tomimori T. Studies on the constituents of *Scutellaria* species (XXII). Constituents of the roots of *Scutellaria amabilis* HARA. *Chem Pharm Bull*, **2006**; 54: 435-441
- Moed H, Stoof TJ, Boorsma DM, von Blomberg BME, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T. Identification of anti-inflammatory drugs according to their capacity to suppress type-1 and type-2 T cell profiles. *Clin Exp Allergy*, **2004**; 34: 1868-1875

- Mora A, Payá M, Ríos JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, **1990**; 40: 793-797
- Morita H, Takeda K, Yagita H, Okumura K. Immunosuppressive effect of leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**; 264: 321-326
- Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol*, **2003**; 225:115-121
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **1983**; 65: 55-63
- Mukarami A, Matsumoto K, Koshimizu K, Ohigashi H. Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon- $\gamma$ -induced I $\kappa$ B degradation in RAW 264.7 macrophages. *Cancer Lett*, **2003**; 195: 17-25
- Mukarami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res*, **2000**; 60: 5059-5066
- Mukarami A, Shigemori T, Ohigashi H. Zingiberaceous and citrus constituents, 1'-acetoxychavicol acetate, zerumbone, auraptene, and nobiletin, suppress lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 24.7 murine macrophages through different modes of action. *J Nutr*, **2005**; 135: 2987 S-2992 S
- Nakae S, Asano M, Horai R, Sakaguchi N, Iwakura Y. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J Immunol*, **2001a**; 167: 90-97
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. Interleukin-1 $\beta$ , but not interleukin-1 $\alpha$ , is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology*, **2001b**; 104: 402-409

- Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayashi S, Torikai K, Hayashi R, Sato T, Ohigashi H, Osawa T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radic Biol Med*, **2003**; 35: 997-1007
- Neves PC, Neves MC, Cruz AB, Sant'Ana AE, Yunes RA, Calixto JB. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C. *Eur J Pharmacol*, **1993**; 243: 213-219
- Nieminen M, Suomi J, Van Nouhuys S, Sauri P, Riekkola ML. Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore. *J Chem Ecol*, **2003**; 29: 823-844
- Nishizuka Y. Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, **1995**; 9: 484-496
- Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*, **2001**; 15: 879-892
- Ohnishi H, Asamoto M, Tujimura K, Hokaiwado N, Takahashi S, Ogawa K, Kuribayashi M, Ogiso T, Okuyama H, Shirai T. Inhibition of cell proliferation by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression, but lack of effect on early rat hepatocarcinogenesis *in vivo*. *Cancer Sci*, **2004**; 95: 936-942
- Olszanecki R, Gebska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol*, **2002**; 53: 571-584
- Ono SJ. Molecular genetics of allergic diseases. *Annu Rev Immunol*, **2000**; 18: 347-366
- Ortiz de Urbina M, Martín ML, Fernández B, San Román L, Cubillo L. In vitro antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin and catalpol. *Planta Med*, **1994**; 60: 512-515

- Padilla HC, Lainez H, Pacheco JA. A new agent (hydrophilic fraction of *Polypodium leucotomos*) for management of psoriasis. *Int J Dermatol*, **1974**; 13: 276-82
- Palkama T, Matikainen S, Hurme M. Tyrosine kinase activity is involved in the protein kinase C induced expression of interleukin-1 $\beta$  gene in monocytic cells. *FEBS*, **1993**; 319: 100-104
- Pan MH, Lai CS, Hsu PC, Wang YJ. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *J Agric Food Chem*, **2005**; 53: 620-630
- Pandey R, Maurya R, Singh G, Sathiamoorthy B, Naik S. Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from *Boerhaavia diffusa* Linn. *Int Immunol*, **2005**; 5: 541-553
- Park KS, Chang IM. Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. *Planta Med*, **2004**; 70: 778-779
- Pennacchio M, Syah YM, Ghisalberti EL, Alexander E. Cardioactive compounds from *Eremophila* species. *J Ethnopharmacol*, **1996**; 53: 21-27
- Petrovic SD, Dobric S, Bokonjic D, Niketic M, Garcia AP, Merfort I. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for an anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats. *J Ethnopharmacol*, **2003**; 87: 109-113
- Posmantur R, Wang K, Gilbertsen B. Caspase-3-like activity is necessary for IL-2 release in activated Jurkat T-cell. *Exp Cell Res*, **1998**; 244: 302-308
- Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. *Eur J Immunol*, **1993**; 23: 3043-3049

- Prieto JM, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *J Ethnopharmacol*, **2003**; 89: 131-137
- Pungitore CR, Ayub MJ, Borowski EJ, Tonn CE, Ciuffo GM. Inhibition of TaqDNA polymerase by catalpol. *Cell Mol Biol*, **2004**; 50: 767-772
- Ramires R, Caiaffa MF, Tursi A, Haeggström JZ, Macchia L. Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**; 324: 815-821
- Rauwald HW, Brehm O, Odenthal KP. Screen of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principle of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytother Res*, **1994**; 8: 135-140
- Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med*, **1994**; 60: 232-234
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, **2001**; 8: 797-807
- Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Sanz MJ, Terencio MC, Máñez S. Two new catalpol derivatives from *Scrophularia auriculata*. *Planta Med*, **1991**; 57: A88.
- Ríos JL, Bas E, Recio MC. Effects of natural products on contact dermatitis. *Curr Med Chem AA & AA*, **2005**; 4: 65-80.
- Ritchie DS, Hermans IF, Lumsden JM, Scanga CB, Roberts JM, Yang J, Kemp RA, Ronchese F. Dendritic cell elimination as an assay of cytotoxic T lymphocyte activity *in vivo*. *J Immunol Methods*, **2000**; 246: 109-117
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*, (3<sup>a</sup> ed), Masson-Salvat: Barcelona, **1994**
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*, (5<sup>a</sup> ed), Harcourt: Madrid, **2000**

- Ross R, AB Reske-Kunz. The role of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol*, **2001**; 1: 1469-1478
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*, **2003**; 48: 601-606
- Sabbagh L, Kaech s, Bourbonnière M, Woo M, Cohen L, Haddad E, Labrecque N, Ahmed R, Sékaly R. The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. *J Immunol*, **2004**; 173: 5425-5433
- Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid. *Mol Pharmacol*, **1995**; 47: 1212-1216
- Sala A, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Anti-phospholipase A<sub>2</sub> and anti-inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Life Sci*, **2000**; 66: PL35-40
- Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *Eur J Pharmacol*, **2003**; 460: 219-226
- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol*, **2002a**; 64: 229-237
- Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potencial of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *J Leukoc Biol*, **2002b**; 71: 73-79

- Sato T, Koike L, Miyata Y, Hirata M, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res*, **2002**; 62: 1025-1029
- Sergeev IN, Li S, Colby J, Ho C-T, Dushenkov S. Polymethoxylated flavones induce Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci*, **2006**; 80: 245-253.
- Shankey T, Danielle R, Nowel P. Kinetics of mitogen-induced proliferation and differentiation of human blood B lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, **1981**; 44: 156-166
- Schleyer V, Landthaler M, Szeimies RM. Novel pharmacological approaches in the treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **2005**; 19: 1-20
- Schwarz T. No eczema without keratinocyte death. *J Clin Invest*, **2000**; 106: 9-10
- Schwerk C, Klaus SO. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol*, **2003**; 66: 1453-1458
- Scott AE, Kashon ML, Yucesoy B, Luster MI, Tinkle SS. Insights into the quantitative relationship between sensitization and challenge for allergic contact dermatitis reactions. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2002**; 183: 66-70
- Sebastiani S, Albanesi C, Nasorri F, Girolomi G, Cavan A. Nickel-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, **2002**; 118: 1052

- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol*, **2003**; 54: 313-318
- Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y. Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease?. *J Dermatol Sci*, **2004**; 36: 1-9
- Sieben S, Hertl M, Al Masaoudi T, Merk HF, Blömeke B. Characterization of T cell responses to fragrances. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2001**; 172: 172-178
- Smith CK, Moore CA, Elahi EN, Smart ATS, Hotchkiss SAM. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2000**; 168: 189-199
- Song R, Mahidhara R, Zhou Z, Hoffman R, Seol D, Flavell R, Billiar T, Otterbein L, Choi A. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol*, **2004**; 172: 1220-1226
- Stanley PL, Syeiner S, Havens M, Tramposch KM. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol*, **1991**; 4: 262-271
- Steele VE, Holmes C A, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC, Kelloff GJ. Lipoyxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **1999**; 8: 467-483
- Streit M, Braathen LR. Contact dermatitis: clinics and pathology. *Acta Odontol Scand*, **2001**; 59: 309-314
- Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmacobiodyn*, **1981**; 4: 565-575

- Sundell IB, Aziz KA, Zuzel M, Theakston RD. The role of phospholipase A<sub>2</sub> in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms. *Toxicon*, **2003**; 41: 459-468
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for mieloperoxidase in human polymorfonuclear leukocytes. *Anal Biochem*, **1983**; 132: 345-352
- Szabó É, László V, Baronki E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*, **2001**; 117: 74-80.
- Takashima A, Mummert M, Kitajima T, Matsue H. New technologies to prevent and treat contact hypersensitivity responses. *Ann N Y Acad Sci*, **2000**; 919: 205-213
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2004**; 286: 431-444
- Theoharides TC, Wang L, Pang X, Letourneau R, Culm KE, Basu S, Wang Y, Correia I. Cloning and cellular localization of the rat mast cell 78-kDa protein phosphorylated in response to the mast cell stabilizer cromolyn. *J Pharmacol Exp Ther*, **2000**; 294: 810-821
- Tou JS. Differential regulation of neutrophil phospholipase D activity and degranulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**; 292: 951-956
- Trautman A, Akdis M, Kleemann D, Altnauer F, Simon HU, Graeve T, Noll M, Bröcker EB, Blaser K, Cezmi A. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*, **2000**; 106: 25-35
- Trautman A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, Dish R, Bröcker EB, Blaser K, Akdis CA. Targeting keratinocyte apoptosis in the

- treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **2001**; 108: 839-846
- Vargo MA, Voss OH, Poustka F, Cardounel AJ, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukaemia cells. *Biochem Pharmacol*, **2006**; 72: 681-692
- Verbeek R, Plomp AC, van Tol AF, van Noort JM. The flavones luteolin and apigenin inhibit *in vitro* antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem Pharmacol*, **2004**; 68: 621-629
- Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*, **2003**, 52; 341-346
- Villar A, Máñez S, Zafra- Polo MC, Ríos JL, Barberán FAT. Identificación de 5-hidroxi- 6,7,8,4'-tetrametoxiflavona en *Sideritis mugronensis* Borja (Labiatae). *Pharmacia Mediterranea*, **1984**; 14: 243-246.
- Villar A, Peris B, Anselmi E, Alcaraz MJ. Actividad antiinflamatoria y antiartrítica de varias especies del género *Sideritis*. *Pharmacia Mediterranea*, **1984**; 15: 247-250.
- Vondráček J, Stika J, Soucek K, Minksová K, Bláha L, Hofmanová J, Kozubík A. Inhibitors of arachidonic acid metabolism potentiate tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in HL-60. *Eur J Pharmacol*, **2001**; 424: 1-11
- Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell B G, Shahid S, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. CD4<sup>+</sup> TH1 and CD8<sup>+</sup> Type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol*, **2000**; 165: 6783-6790
- Wang L, Correia I, Basu S, Theoharides TC. Calcium and phorbol ester effect on the mast cell phosphoprotein induced by cromolyn. *Eur J Pharmacol*, **1999**; 371: 241-249

- Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B, Sauder DN. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res*, **2002**; 22: 407-412
- Wei BL, Lu CM, Tsao LT, Wang JP, Lin CN. *In vitro* anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. *Planta Med*, **2001**; 67: 745-747
- Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, Bryson DG, Pollock JM. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, **2005**; 114: 101-111
- Wenzel U, Kunz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, **2000**; 60: 3823-3831
- Wertz O, Szellas D, Henseler M, Steinhilber D. Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol Pharmacol*, **1998**; 54: 445-451
- Whitmore JK, Ahmed R. The economy of T-cell memory: CD4<sup>+</sup> recession in times of CD8<sup>+</sup> stability?. *Nature Med*, **2001**; 7: 892-893
- Wilhelm S, Wagner h, Hacker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol*, **1998**; 28: 891-900
- Wimer BM. Therapeutic immunostimulating effects of plant mitogens exemplified by the L4 isolectin of PHA. *Cancer Biother Radiopharm*, **1997**; 12: 195-212
- Wong HR, Menéndez IY. Sesquiterpene lactones inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**; 262: 375-380
- Woo ER, Pokharel YR, Yang JW, Lee SY, Kang KW. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation by 2',8''-biapigenin. *Biol Pharm Bull*, **2006**; 29: 976-980

- Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS*, **2005**; 579: 705-711
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*, **2001**; 296, 181-187
- Xu B, Bulfone-Paus S, Aoyama K, Yu S, Huang P, Morimoto K, Matsushita T, Takeuchi T. Role of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in murine contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol*, **2003**; 3: 927-938
- Xu H, Dilulio NA, Fairchild RLT. Cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon  $\gamma$ -producing (T<sub>C1</sub>) effector CD8<sup>+</sup> T cells and interleukin (IL)-4/IL-10-producing (Th<sub>2</sub>) negative regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, **1996**; 183: 1001-1012
- Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, Fang S, Tamura T, Matsumoto S, Aiba Y, Teruya K, Osada K, Nishikawa R, Shirahata S. IL-10 augments antibody production in *in vitro* immunized lymphocytes by inducing a Th2-type response and B cell maturation. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2004**; 68: 2279-2284
- Yamada N, Sugasawa K. Pharmacological modulation of delayed-type hypersensitivity in mice. *Arzneim-Forsch*, **1996**; 46: 884-886
- Yamazaki M, Hirota K, Chiba K, Mohri T. Promotion of neuronal differentiation of PC12h cells by natural lignans and iridoids. *Biol Pharm Bull*, 1994; 17: 1604-1608

- Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*, **1992**; 52: 6676-6681
- Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Konho S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, **1983**; 116: 612-618
- Young JM, De Young LM. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In Spector J, Back N editors. *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. Alan R. Liss: New York; **1989**, p. 215-231
- Yousefi S, Green DR, Blaser K, Simon HU. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91: 10868-10872
- Zheng Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Sakata K, Matsumoto Y, Sayama Y, Mori H. Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, **2002**; 128: 539-546
- Zhou JR, Mukherjee P, Gugger ET, Tanaka T, Blackburn GL, Clinton SK. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *Cancer Res*, **1998**; 58: 5231-5238
- Zunic M, Barh GM, Mudde GC, Meingassner JG, Lam C. MDP(Lysyl)GDP, a non-toxic muramyl dipeptide derivative, inhibits cytokine production by activated macrophages and protects mice from phorbol ester. *J Invest Dermatol*, **1998**; 111: 77-82

Tabla resumen de los resultados obtenidos para 5-O-desmetilnobiletina

**IN VIVO Y EX VIVO**

**HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA**

DNFB	24 h 47%	48 h 40%	72 h 38%
OXZ	24 h 29%	48 h 23%	72 h 28%
SRBC	18 h 24%	24 h 24%	48 h 57%

**INFLAMACIÓN**

TPA, MPO	48%, 78%		
Carragenina	3h 47%	5h 26%	
PLA <sub>2</sub>	30 min 30%	60 min 65%	90 min 38%
	DE <sub>50</sub> 69 mg/kg		

**IN VITRO**

**ENZIMAS, METABOLITOS Y FACTORES DEL PROCESO INFLAMATORIO**

Elastasa	%I <sub>10μM</sub> 41%
5-LOX, 12-LOX y COX-1	CI <sub>50</sub> 0,35 μM, %I <sub>10μM</sub> 49%, %I <sub>10μM</sub> 44%
Actividad, expres. iNOS	CI <sub>50</sub> 7,53 μM, %I <sub>5μM</sub> 17%
Actividad, expres. COX-2	%I <sub>2,5μM</sub> 46%, %I <sub>5μM</sub> 20%
NF-κB	NI <sup>a</sup>

**CÉLULAS Y MEDIADORES DEL PROCESO ALÉRGICO**

Proliferación linfocitaria	CI <sub>50</sub> 2,76 μM
Ciclo celular en linfocitos - según concentración - a distintos tiempos	72h: G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> , independiente de C <sup>c</sup> I a > tiempo de exposición, G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
Liberación de citocinas:	
IL-1β	%I <sub>2,5μM</sub> 47%
IL-2	CI <sub>50</sub> 1,63 μM
IL-4	CI <sub>50</sub> 2,74 μM
IL-10	%P <sub>10μM</sub> 46%
TNF-α	CI <sub>50</sub> 0,66 μM
IFN-γ	CI <sub>50</sub> 1,35 μM

**APOPTOSIS**

Ruptura de ADN	Si
Anexina V-FITC	Induce apoptosis en células con PHA
Caspasa-3	%I <sub>25μM</sub> 41%, %I <sub>10μM</sub> 34%

NI<sup>a</sup> No Inhibe

C<sup>c</sup> Concentración

Tabla resumen de los resultados obtenidos para **Escropoliósido A** y **Escrovalentinósido**

<b>IN VIVO Y EX VIVO</b>		
<b>HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA</b>		
	<b>SC</b>	<b>SV</b>
DNFB	-	-
OXZ	48 h 30% 72 h 79%	48 h 41% 72 h 57%
SRBC	18 h 47% 24 h 45% 48 h 36%	48 h 46%

<b>IN VITRO</b>		
<b>ENZIMAS, METABOLITOS Y FACTORES DEL PROCESO INFLAMATORIO</b>		
Elastasa	%I <sub>50µM</sub> 69%	-
5-LOX	CI <sub>50</sub> 70 µM	CI <sub>50</sub> 61 µM
Actividad, expresión iNOS	CI <sub>50</sub> 78 µM, %I <sub>100µM</sub> 33%	CI <sub>50</sub> 69 µM, %I <sub>100µM</sub> 13%
Actividad, expresión COX-2	%I <sub>50µM</sub> 30%, %I <sub>100µM</sub> 33%	%I <sub>50µM</sub> 31%, %I <sub>100µM</sub> 22%
NF-kB	I <sup>b</sup>	NI <sup>a</sup>

<b>CÉLULAS Y MEDIADORES DEL PROCESO ALÉRGICO</b>		
Proliferación linfocitaria	CI <sub>50</sub> 68 µM	CI <sub>50</sub> 69 µM
Ciclo celular en linfocitos - según concentración - a distintos tiempos	72h: S, indp C <sup>c</sup> I y ↑ sub G <sub>0</sub> a 0, 18, 24h	72h: S, indp C <sup>c</sup> I S → M a 0-6 h
Liberación de citocinas:		
IL-1β	CI <sub>50</sub> 46 µM	CI <sub>50</sub> 29 µM
IL-2	CI <sub>50</sub> 7,52 µM	CI <sub>50</sub> 16 µM
IL-4	CI <sub>50</sub> 23 µM	CI <sub>50</sub> 20 µM
IL-10	%P <sub>100µM</sub> 10%	%I <sub>100µM</sub> 18%
TNF-α	CI <sub>50</sub> 29 µM	CI <sub>50</sub> 60 µM
IFN-γ	CI <sub>50</sub> 2,77 µM	CI <sub>50</sub> 12 µM

<b>APOPTOSIS</b>		
Ruptura de ADN	No	No
Anexina V-FITC	No apoptosis	No apoptosis
Caspasa-3	-	-

I<sup>b</sup> Inhibe

C<sup>c</sup> Concentración