

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Trabajo Final de Graduación

**Caracterización química y biológica de compuestos
inmunomoduladores de la planta *Piper garagaranum*
C. DC.**

B.Q Antonio Sáenz Castillo

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2021

Índice general

1. Dedicatoria y agradecimientos	ii
2. Resumen	ix
3. Introducción	1
3.1. Sistema inmunológico	1
3.2. Inflamación	2
3.3. Factor de transcripción NF- κ B	4
3.4. Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)	7
3.5. Citoquinas	11
3.6. Inmunomoduladores	14
3.7. Familia Piperaceae	16
3.7.1. Género <i>Piper</i>	17
3.7.2. Taxonomía	17
3.7.3. Fitoquímica del género <i>Piper</i>	18
3.7.4. Aspectos generales de actividad biológica	21
3.7.5. <i>Piper garagaranum</i> C. DC.	22
3.8. Fundamentos de los ensayos biológicos	23
3.8.1. Reacción de Griess	24
3.8.2. Reacción de MTT para evaluar viabilidad celular	26
3.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	26
4. Justificación	31
5. Objetivos	33
6. Reactivos y equipos	34
6.1. Reactivos	34
6.2. Equipos	34
7. Métodos	36
7.1. Recolección e identificación de <i>Piper garagaranum</i> C. DC.	36
7.2. Extracción y aislamiento	36
7.2.1. Esquema de separación	40
7.3. Caracterización y elucidación estructural	42
7.4. Bioensayos	42
7.4.1. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y viabilidad celular	42
7.4.2. Evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo	44

7.4.3.	Determinación de IC ₅₀ de los compuestos 1 y 2	44
7.4.4.	Ensayo inhibición directa de iNOS	45
7.4.5.	Efecto de los compuestos sobre la expresión de genes por medio de PCR en tiempo real	45
8.	Resultados y discusión	48
8.1.	Caracterización química de los compuestos 1 y 2	48
8.2.	Actividad de los compuestos en los ensayos biológicos	53
8.3.	Estudio del posible mecanismo de acción sobre células RAW 264.7	57
8.4.	Efecto de los compuestos 1 y 2 sobre la expresión de genes relacionados con el proceso de inflamación	59
9.	Conclusiones	67
10.	Anexo I	72

Índice de figuras

3.1.	La ruta de señalización canónica del factor de transcripción NF- κ B es activada por TNF, IL-1 y ligandos de TLR como LPS, entre otros. Imagen tomada y modificada de [8].	6
3.2.	Ruta canónica de señalización de NF- κ B y los posibles sitios de inhibición para terapias anti-inflamatorias. Imagen modificada de [7].	7
3.3.	La forma dimérica de iNOS tiene capacidad catalítica para la generación de NO a partir de L-arginina y O ₂	9
3.4.	Reacción global de producción de NO por iNOS.	9
3.5.	Cofactores y co-catalizadores de la enzima iNOS.	10
3.6.	(A) Los monómeros de NOS son capaces de transferir electrones de NADPH a FAD y FMN teniendo capacidad limitada para reducir O ₂ a superóxido. Los monómeros y dominios reductasa pueden enlazar a calmodulina (CaM), lo cual aumenta la eficacia de transferencia de electrones en el dominio reductasa. Los monómeros no se pueden enlazar al cofactor BH ₄ lo que provoca que no se pueda enlazar los sustratos para catalizar la formación de NO. (B) En presencia del grupo heme, NOS puede formar el dímero funcional ya que es un interdominio esencial para la transferencia de los electrones de las flavinas y para la activación del O ₂ . Imagen tomada y modificada de [10].	10
3.7.	Estructura molecular del agente inmunosupresor ciclosporina.	15
3.8.	Compuestos con diferentes actividades biológicas aislados de varias especies del género <i>Piper</i>	20
3.9.	A) y D) <i>Piper garagaranum</i> C. DC. encontrada en la literatura. ⁴² B) y C) <i>Piper garagaranum</i> recolectada en junio del 2019, Horquetas de Sarapiquí, Costa Rica.	23
3.10.	Reacción de Griess reportada originalmente. Bajo condiciones ácidas el nitrito reacciona con el ácido sulfanílico para formar el catión diazo, el cual acopla con la α -naftilamina en posición para formando el pigmento azo.	25
3.11.	Reacción de Griess modificada y usada actualmente. Bajo condiciones ácidas el nitrito reacciona con la sulfanilamida para formar el catión diazo, el cual acopla con la N-(1-naftil) etilendiamina en posición para formando el pigmento azo.	25
3.12.	Reacción de reducción del MTT a la sal de formazán.	26
3.13.	Reacción en cadena de la polimerasa. En cada ciclo las hebras se separan mediante calor, la hibridación con primers se lleva a cabo cuando la temperatura disminuye y la ADN polimerasa lleva a cabo la extensión de las nuevas hebras. Imagen tomada y modificada de [46].	27

3.14. Esquema de un equipo de PCR en tiempo real. Las muestras son excitadas en el termociclador mediante una fuente de energía, la fluorescencia es reflejada y pasa por un filtro a un fotodetector.	29
7.1. Monitoreo de la separación del depurado por VLC en fase reversa revelado con anisaldehído en placas de cromatografía en capa fina. (Fase móvil 95:5 CH ₂ Cl ₂ :MeOH)	38
7.2. Cromatograma de la separación por HPLC semi-preparativo de las fracciones Pg-DEP-36 y Pg-DEP-37.	39
7.3. Estructura de los ácidos hidroxibenzóicos prenilados aislados de <i>P. garagaranum</i>	42
7.4. Programa de temperatura utilizado para las reacciones de PCR en tiempo real y la curva de disociación para el control de calidad del producto de la reacción.	46
8.1. Correlaciones clave de HMBC (H→C, flechas rojas) y COSY (¹ H- ¹ H, flechas negras) para el compuesto 1	50
8.2. Correlaciones clave de HMBC (H→C, flechas rojas) y COSY (¹ H- ¹ H, flechas negras) para el compuesto 2	51
8.3. Determinación de los valores de IC ₅₀ para los compuestos 1 (izquierda) y 2 (derecha). Las curvas verdes corresponden a la inhibición en la producción de NO, las curvas azules la viabilidad celular evaluada por MTT y las curvas rojas a la evaluación de la viabilidad celular por medio de citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio (círculos rojos). Cada punto para el ensayo de citometría de flujo es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar y cada punto para los ensayos de NO y MTT es el promedio de tres repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.	56
8.4. Estructuras moleculares de la (a) L-arginina y (b) L-canavanina	58
8.5. Inhibición en la producción de NO al añadir las sustancias luego de haber estimulado con LPS para los compuestos 1 , 2 y L-canavanina en células RAW 264.7. Cada punto es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.	58
8.6. Efecto en la viabilidad celular al añadir las sustancias luego de haber estimulado con LPS para los compuestos 1 , 2 y L-canavanina en células RAW 264.7. Cada punto es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.	59

8.7. Efecto del compuesto 1 en los niveles de expresión de los genes CCL2, CXCL2, IL-10, IL-1 β , TGF- β y TNF- α en células RAW 264.7 activadas con LPS. Las células RAW 264.7 fueron pretratadas con el compuesto 1 a concentraciones de 10, 18 y 25 μ M por 24 h seguido por la activación con LPS a 1 μ g/mL por 4 h. El ARN se extrae, retrotranscrito y es usado para las reacciones de PCR en tiempo real utilizando el gen de referencia GAPDH para mostrar la expresión relativa. Los valores muestran el promedio y las barras de error corresponden a una desviación estándar. ** son significativamente distintos ($p < 0.05$) al control positivo (CP).	63
8.8. Estructura molecular de los diferentes tocotrienoles.	64
8.9. Estructuras moleculares de los compuestos (a) 3-PAP y (b) 3-GAP	66
8.10. Estructuras del compuesto Baicaleína y sus derivados.	66
10.1. Análisis de HRESIMS para el compuesto 1 . (ESI+)	72
10.2. Espectro de ^1H -RMN (600MHz, CD_3CN) del compuesto 1	73
10.3. Espectro de ^{13}C -RMN (150MHz, CD_3CN) del compuesto 1	74
10.4. Espectro COSY del compuesto 1	75
10.5. Espectro de HMBC del compuesto 1	76
10.6. Espectro de HSQC del compuesto 1	77
10.7. Espectro de HSQC-TOCSY del compuesto 1	78
10.8. Análisis de HRESIMS para el compuesto 2 . (ESI+)	79
10.9. Espectro de ^1H -RMN (600MHz, CD_3CN) del compuesto 2	80
10.10 Espectro de ^{13}C -RMN (150MHz, CD_3CN) del compuesto 2	81
10.11 Espectro COSY del compuesto 2	82
10.12 Espectro de HMBC del compuesto 2	83
10.13 Espectro de HSQC del compuesto 2	84
10.14 Espectro de HSQC-TOCSY del compuesto 2	85
10.15 Determinación de pureza por UHPLC del compuesto 1	86
10.16 Determinación de pureza por UHPLC del compuesto 2	87

Índice de cuadros

6.1. Lista de reactivos utilizados en el trabajo.	34
6.2. Lista de equipos utilizados en el trabajo.	35
7.1. Recuperaciones de masa obtenidas en el proceso de depuración del extracto crudo.	37
7.2. Primers utilizados en qRT-PCR para el ensayo de expresión de genes. . . .	47
8.1. Datos de ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150MHz) de los compuestos 1 y 2. (Medido en $\text{CH}_3\text{CN}-d_3$)	52
8.2. Valores de IC_{50} obtenidos para los compuestos 1 y 2 aislados de <i>Piper garagaranum</i> C. DC. en los ensayos de actividad biológica.	55

Resumen

La separación guiada por bioensayo de la especie *Piper garagaranum* C. DC. mediante técnicas cromatográficas llevó al aislamiento y elucidación estructural mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear y masa de alta resolución de dos ácidos hidroxibenzoicos prenilados (**1** y **2**) con actividades anti-inflamatorias y citotóxicas en una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Se obtuvieron valores de IC₅₀ para la producción de óxido nítrico mediante la reacción de Griess de 18 ± 3 y 26 ± 5 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente y para la viabilidad celular evaluada por MTT de 28 ± 4 y 56 ± 5 $\mu\text{mol/L}$, mostrando una actividad anti-inflamatoria asociada a la citotoxicidad que fue posteriormente evaluada por medio de citometría de flujo. Los compuestos no disminuyen la producción de óxido nítrico por medio de una inhibición competitiva por el sitio activo de la enzima iNOS, además muestran una actividad anti-inflamatoria al disminuir la expresión de genes pro-inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , CXCL2, CCL2) y no estimulan la producción de genes anti-inflamatorios (IL-10, TGF- β) determinado mediante PCR en tiempo real. Este trabajo es un primer estudio fitoquímico de la especie y se reporta un primer estudio de actividad biológica de este tipo de compuestos aislados.

Introducción

Los productos naturales han contribuido de manera importante a las terapias inmunomoduladoras. Desde tiempos antiguos se han utilizado medicinas naturales para el tratamiento de enfermedades. Se conocen una gran variedad de compuestos de origen natural que ejercen una influencia sobre el sistema inmune para afectar sus funciones sobre las células y mantener la homeostasis del cuerpo. Por ello, la búsqueda de nuevos compuestos es de relevancia para encontrar nuevos tratamientos, con el fin de complementar los existentes o desarrollar nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.¹

3.1. Sistema inmunológico

La inmunidad es el sistema natural del organismo para la protección ante diferentes enfermedades infecciosas. Este sistema puede distinguir sustancias extrañas y organismos externos de células propias, generando una respuesta coordinada y colectiva de células específicas y mediadores contra estas entidades en lo que se conoce como una respuesta inmune.²

El sistema inmune está compuesto de una serie de órganos, células y moléculas con roles especializados para la defensa contra las infecciones. Existen dos tipos de respuestas fundamentales, la respuesta innata y la respuesta adaptativa. La respuesta inmune innata siempre está presente y ocurre cuando un agente infeccioso entra en contacto con células especializadas. Es una defensa no específica, ya que opera sin importar la identidad del patógeno o invasor presente. Esta respuesta hace uso de células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, monocitos), células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastoci-

tos) y células asesinas naturales (NK, por su siglas en inglés).³ Por otra parte, la respuesta adaptativa involucra la activación y proliferación de linfocitos B o T que reconocen antígenos específicos. Esta mejora con repetidas exposiciones al agente infeccioso y los linfocitos median la destrucción selectiva de un patógeno o toxina que es recordado y reconocido para luego ejecutar una respuesta más rápida en el futuro. La respuesta adaptativa tiene dos mecanismos distintos para combatir infecciones, el sistema de defensa mediado por anticuerpos (inmunidad humoral, mediada por linfocitos B) y el sistema de defensa mediado por células (inmunidad celular, ejecutada por linfocitos T).⁴

La organización del sistema inmune se puede ver en varias etapas. La primera es la piel y membranas mucosas que funcionan como una primera barrera contra las infecciones. Posteriormente intervienen aspectos fisiológicos como la temperatura y el pH del organismo que proveen una forma de protección contra patógenos. Cuando estas barreras se rompen, tanto el sistema innato como el adaptativo entran en función. Ambos sistemas, como ya se mencionó, constan de una multitud de células y moléculas que interaccionan de una manera compleja para detectar y eliminar patógenos. Esta detección y eliminación se da por medio de receptores que poseen las células, los cuales pueden reconocer patógenos, moléculas o enlazar otras células para activarlas mediante un sistema de transducción de señales que lleva a cabo la respuesta inmune.⁴

3.2. Inflamación

La inflamación forma parte de la respuesta inmune a estímulos dañinos como patógenos, células dañadas, compuestos tóxicos o irradiación. Actúa removiendo estos estímulos e iniciando un proceso de recuperación. Es un mecanismo de defensa vital para la salud que permite minimizar eficientemente infecciones y lesiones mediante eventos celulares y moleculares. Este proceso de mitigación contribuye a la restauración de la homeostasis de

los tejidos. Sin embargo, las inflamaciones agudas no controladas pueden transformarse en enfermedades crónicas como problemas cardiovasculares, diabetes, artritis y cáncer. A nivel de tejido, la inflamación se caracteriza por la aparición de los síntomas cardinales de la inflamación: hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función del tejido que resulta de la respuesta inflamatoria a la infección o lesión.

Hay factores patogénicos como infecciones o lesiones de tejidos que pueden inducir la inflamación. La etiología de la inflamación puede ser infecciosa o no infecciosa y para remediar este daño, el cuerpo inicia una cascada de señalizaciones que estimulan respuestas enfocadas en la sanación del tejido afectado.

La respuesta inflamatoria consiste en una activación coordinada de rutas de señalización que regulan mediadores inflamatorios en las células de los tejidos y células inflamatorias de la sangre. En este proceso las células inflamatorias activadas que incluyen neutrófilos, eosinófilos, fagocitos mononucleares y macrófagos producen varios tipos de mediadores inflamatorios como NO, prostaglandinas E2 y citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α .⁵ El proceso de respuesta depende de la naturaleza del estímulo inicial y del sitio en que se genere, pero siempre se comparte un mismo mecanismo: 1) las células reconocen el estímulo mediante receptores en su superficie, 2) se activan las rutas de señalización, 3) se liberan mediadores inflamatorios y 4) se reclutan células inflamatorias al sitio de infección (quimiotaxis).

La respuesta inflamatoria se activa mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) que se expresan en células inmunes y detectan estructuras microbianas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y los patrones moleculares asociados a daños (DAMPs, por sus siglas en inglés). Los DAMPs son biomoléculas que pueden iniciar y perpetuar una respuesta inflamatoria no infecciosa. Al secretarlas, células dañadas pueden reclutar células innatas

inflamatorias en ausencia de patógenos.⁶ Hay diferentes clases de PRRs que incluyen los receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), receptores tipo C lectina (CLRs), receptores tipo NOD (NLRs), entre otros. Los TLRs son receptores y PRRs en mamíferos que participan en la activación de la respuesta inflamatoria. Se han identificado más de 10 receptores de esta familia y son de los receptores más estudiados. Estos son los encargados de transmitir señales relacionadas con los PAMPs, cómo por ejemplo el reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) por el TLR-4. La interacción de un ligando con los TLRs activa una cascada de señalización intracelular que provoca la translocación nuclear de factores de transcripción como el factor de transcripción AP-1, el factor de transcripción NF- κ B ó el factor regulador IRF3. Los DAMPs y PAMPs pueden compartir receptores como es el caso del TLR-4, lo cual sugiere una similitud entre las respuestas inflamatorias infecciosas y no infecciosas.⁶

Los estímulos inflamatorios primarios incluyen productos microbianos, pero también moléculas señalizadoras endógenas como citoquinas, por ejemplo, la interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estos estímulos inducen la inflamación mediante su interacción con los TLRs, receptores IL-1R, receptores IL-6R y receptores TNFR, respectivamente. La activación de estos receptores provoca que se activen las rutas de señalización intracelular como las rutas MAPK, NF- κ B, JAK y STAT.⁶

3.3. Factor de transcripción NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B regula múltiples procesos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Sirve como un mediador de respuestas inflamatorias e induce la expresión de un gran número de genes pro-inflamatorios incluyendo los genes que codifican para citoquinas y quimiocinas, así como también participa en la regulación de inflama-

somas. Este factor de transcripción juega un papel crítico en la regulación, activación y diferenciación de las células del sistema inmune innato y las células T.

Este factor de transcripción es una familia de proteínas que está compuesta por 5 miembros estructuralmente relacionados, NF- κ B1 (también conocida como p50), NF- κ B2 (p52), RELA (p65), RELB y c-REL. Estas proteínas pueden formar homo ó heterodímeros y regulan la transcripción de genes enlazándose a un elemento específico de ADN. El dímero canónico de NF- κ B lo componen las subunidades p65 y p50. En ausencia de un estímulo, estas proteínas están secuestradas en el citoplasma por una familia de proteínas inhibitoras, conocidas como I κ B, que se caracterizan estructuralmente por la presencia de repeticiones de ankirina.⁷

La activación de NF- κ B se da por una de dos principales rutas de señalización: la canónica y la no-canónica. Ambas rutas son importantes para la regulación de las respuestas inmune e inflamatorias a pesar de las diferencias en sus mecanismos de transducción de señales. Funcionalmente, la ruta canónica esta involucrada en casi todos los aspectos de la respuesta inmune, mientras que la no canónica funciona como un eje suplementario de señalización que coopera con la ruta canónica al regular funciones específicas del sistema inmune adaptativo.

La ruta canónica se activa en respuesta a diversos estímulos, incluyendo varios receptores de citoquinas, PRRs, receptores de TNF, receptores de células T y B. El mecanismo primario de la activación canónica de NF- κ B se da por la degradación de I κ B α (ver figura 1), lo cual implica la fosforilación sitio-específica por el complejo multisubunidad kinasa (IKK). IKK se compone de dos subunidades catalíticas IKK α e IKK β y una subunidad reguladora llamada modulador esencial de NF- κ B (NEMO) ó IKK γ . Este complejo puede ser activado por diferentes estímulos incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, mitógenos, componentes microbianos y agentes estresantes.⁷ Al activarse, IKK fosforila

dos serinas N-terminales del inhibidor $I\kappa B\alpha$, lo cual induce la degradación dependiente de ubiquitina de $I\kappa B\alpha$ por el proteasoma, resultando en la liberación de $NF-\kappa B$ y su rápida y transitoria translocación al núcleo y ligación de los promotores de genes asociados (ver figura 3.1). Como resultado se da la transcripción de un gran número de genes inflamatorios como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$, $COX-2$ e $iNOS$.

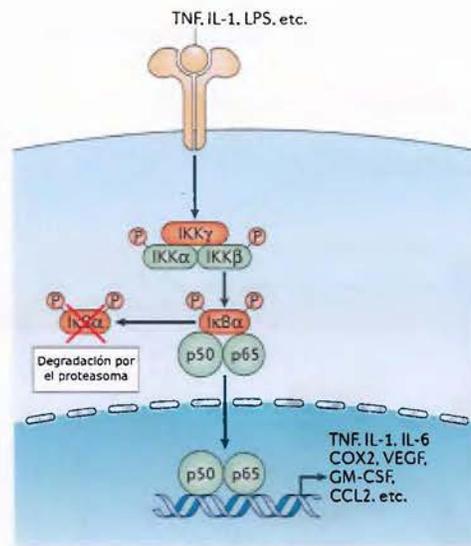


Figura 3.1: La ruta de señalización canónica del factor de transcripción $NF-\kappa B$ es activada por TNF , $IL-1$ y ligandos de TLR como LPS , entre otros. Imagen tomada y modificada de [8]

El factor de transcripción $NF-\kappa B$ ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, aterosclerosis, diabetes tipo I, asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Debido a que una desregulación de la activación de este factor de transcripción se relaciona con varias enfermedades, resulta atractivo dirigir terapias anti-inflamatorias hacia esta ruta de señalización.⁷

Existen varias categorías de inhibidores que se han desarrollado para bloquear diferen-

tes pasos de la señalización de NF- κ B, y se resumen en la figura 3.2. La primera categoría incluye los inhibidores de IKK, que se han desarrollado para bloquear la actividad catalítica y para que no se lleve a cabo la fosforilación de I κ B α . Por ejemplo, la aspirina y el salicilato son capaces de inhibir IKK. Una segunda categoría consiste en los inhibidores del proteasoma como el medicamento Velcade® y la lactacistina, que pueden bloquear la degradación de I κ B α en el proteasoma. Además de los anteriores, los inhibidores que bloquean la translocación al núcleo de las subunidades de NF- κ B como el medicamento Tacrolimus y por último, los inhibidores que bloquean la actividad enlazante al ADN de NF- κ B como algunos glucocorticoides.⁷

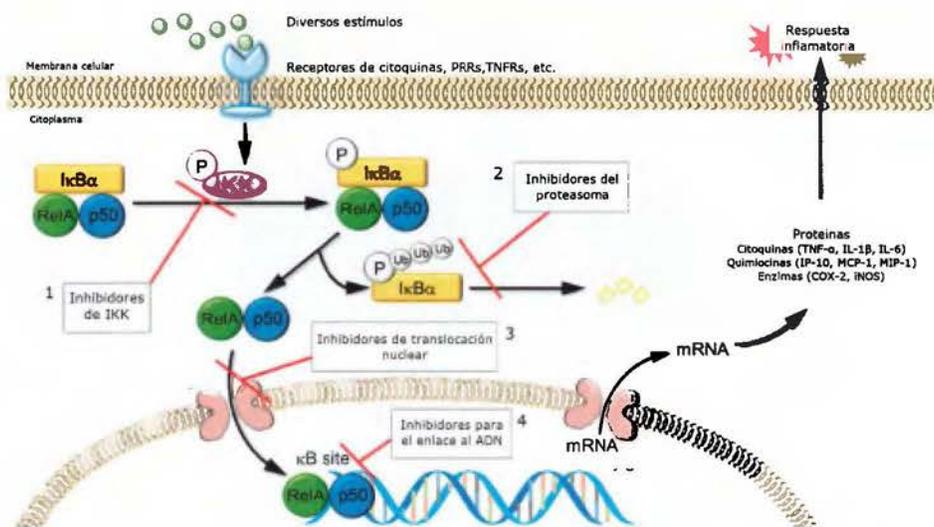


Figura 3.2: Ruta canónica de señalización de NF- κ B y los posibles sitios de inhibición para terapias anti-inflamatorias. Imagen modificada de [7].

3.4. Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)

El óxido nítrico (NO) y el superóxido (O_2^-) son mediadores importantes en las enfermedades inflamatorias y controla algunas funciones regulatorias como neurotransmisión, regulación de la transcripción de genes, traducción de ARNm y generan modificaciones

post-traducción de proteínas.⁹ Un importante modo de inactivación del NO es su reacción con el anión superóxido para formar el muy oxidante anión peroxinitrito (ONOO^-), que puede causar daño oxidativo, nitraciones, S-nitrosilaciones de biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN.¹⁰ Los efectos inflamatorios del NO parecen estar mediados por mecanismos de radicales libres y están asociados con la expresión inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS).¹¹

En mamíferos, hay tres distintas isoformas de la sintasa de óxido nítrico (NOS): la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). Son producto de diferentes genes con diferentes regulaciones y propiedades catalíticas. Tanto eNOS como nNOS se encuentran principalmente en células endoteliales y neuronales respectivamente y su expresión es constitutiva, ya que se expresan a un nivel constante en las células, sin embargo, son isoformas inactivas que necesitan enlazarse a una proteína (calmodulina) para generar NO.¹² Por otro lado, muchas células tienen la habilidad de expresar iNOS, como los macrófagos, neutrófilos, hepatocitos y células de músculo liso. En células de macrófagos ó similares, iNOS se expresa en respuesta a varias citoquinas, endotoxinas de bacterias ó lipopolisacáridos (LPS), en esta isoforma la proteína calmodulina ya se encuentra asociada con iNOS como un grupo prostético lo cual explica que no requiere activación.¹¹

La proteína iNOS está reportada en forma monomérica y dimérica. La forma monomérica contiene los cofactores FAD, FMN y calmodulina (CAM), pero no contiene el grupo heme ni la tetrahydrobiopterina (BH_4). Esta forma disociada de las subunidades de NOS no es catalíticamente activa. La incorporación de calmodulina y BH_4 dentro de un dímero genera una holoenzima catalíticamente activa. (ver figura 3.3)¹²

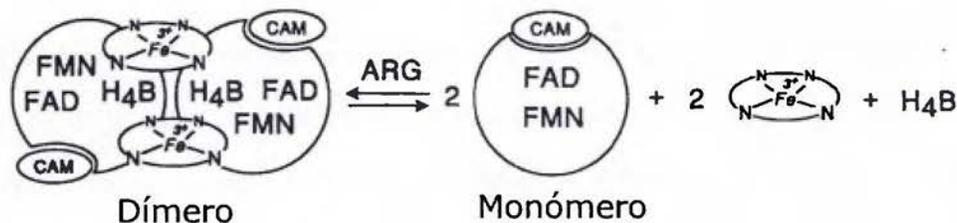


Figura 3.3: La forma dimérica de iNOS tiene capacidad catalítica para la generación de NO a partir de L-arginina y O₂.

Todas las isoformas de NOS llevan a cabo la oxidación del aminoácido L-arginina para formar NO y L-citrulina como productos. La reacción es una oxidación de 5 electrones del nitrógeno guanidinio que involucra una N-hidroxilación inicial en esa posición y requiere NADPH y O₂.¹² La síntesis de NO se da en dos pasos: hidroxilación de L-arginina a N^ω-hidroxi-L-arginina y oxidación del producto anterior a L-citrulina y NO.¹⁰ (ver figura 3.4)



Figura 3.4: Reacción global de producción de NO por iNOS.

Todas las NOS están compuestas de un dominio reductasa y uno oxigenasa. Los dominios reductasa contienen sitios de enlace para NADPH, FAD y FMN y calmodulina (ver figura 3.5). La protoporfirina IX y la tetrahidrobiopterina (BH₄) forman parte del dominio oxigenasa y de sustrato de las NOS, y el grupo heme liga y activa el O₂ para la subsecuente transformación oxidativa de L-arginina a NO. (ver figura 3.6),¹²¹³

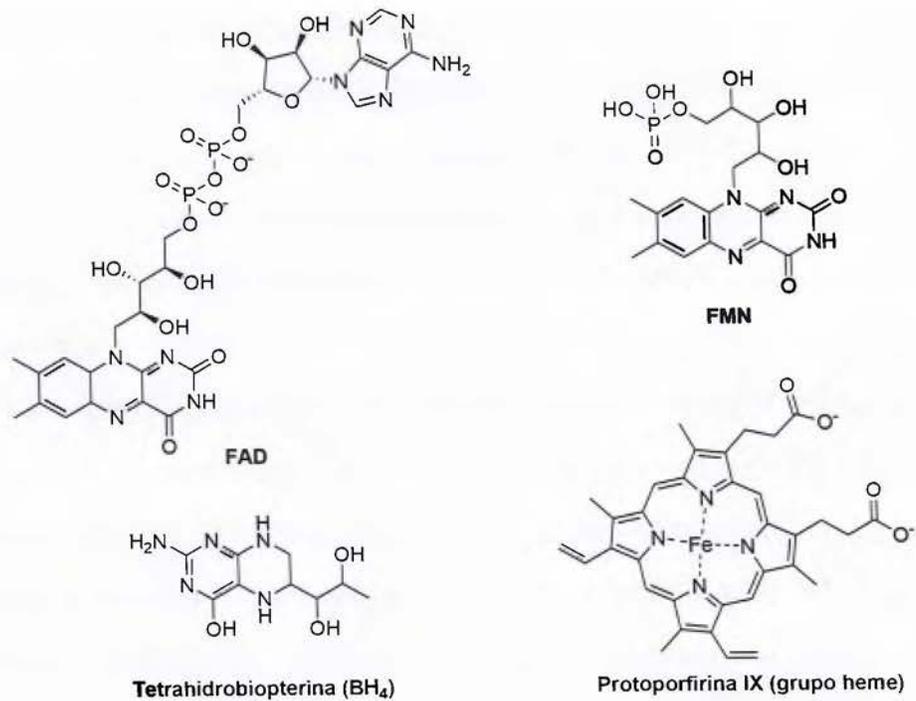


Figura 3.5: Cofactores y co-catalizadores de la enzima iNOS.

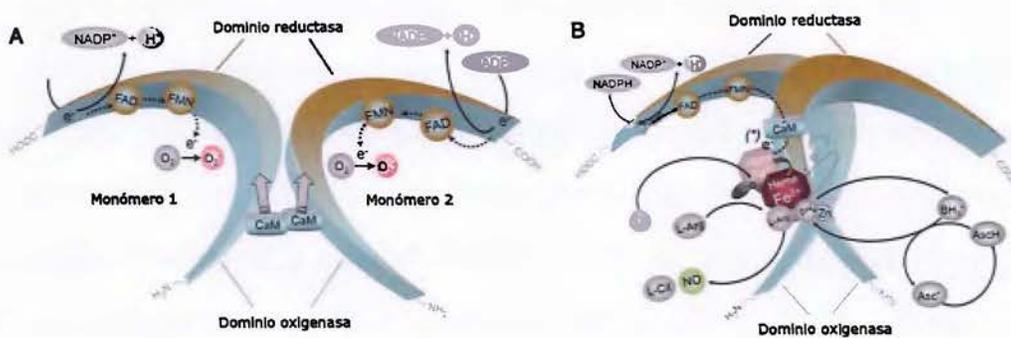


Figura 3.6: (A) Los monómeros de NOS son capaces de transferir electrones de NADPH a FAD y FMN teniendo capacidad limitada para reducir O₂ a superóxido. Los monómeros y dominios reductasa pueden enlazar a calmodulina (CaM), lo cual aumenta la eficacia de transferencia de electrones en el dominio reductasa. Los monómeros no se pueden enlazar al cofactor BH₄ lo que provoca que no se pueda enlazar los sustratos para catalizar la formación de NO. (B) En presencia del grupo heme, NOS puede formar el dímero funcional ya que es un interdominio esencial para la transferencia de los electrones de las flavinas y para la activación del O₂. Imagen tomada y modificada de [10].

En respuesta a estimulación con LPS, los macrófagos expresan iNOS, además de citoquinas como IFN- γ , IL-6, TNF- α y otros productos génicos. Todos estos mediadores activan la expresión de iNOS mediante su enlace a receptores específicos en la membrana. En el caso del LPS, este enlaza e induce la transducción de señales a través del receptor TLR-4 resultando en la activación del factor de transcripción NF- κ B. Citoquinas como IFN- γ , IL-6, IL-1 β y TNF- α se enlazan a sus respectivos receptores y activan diferentes rutas de señalización resultando en la activación de factores de transcripción como AP1, C/EBP, NF- κ B y STATs. La inhibición de la expresión de iNOS se puede dar por numerosos agentes que lo que hacen es inhibir la activación de NF- κ B. También puede resultar por la captura de NF- κ B por interacciones proteína-proteína, bloqueando la translocación nuclear del factor o aumentando la expresión del inhibidor del factor de transcripción.¹⁴

3.5. Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas (8 a 40 000 kDa) secretadas por las células, las cuales median efectos específicos en la interacción y comunicación entre células. Estas proteínas pueden actuar en las células que las secretaron (acción autocrina), en células vecinas (acción paracrina) o en algunas instancias en células distantes (acción endocrina). Es común para diferentes tipos de células secretar la misma citoquina o que una pueda actuar en diferentes tipos de células, concepto que se le conoce como pleiotropía. Pueden ser redundantes en su actividad debido a que funciones similares pueden ser estimuladas con diferentes citoquinas y se producen en cascada, una citoquina estimula otras células para producir otra serie de estos mediadores.¹⁵

No hay secuencia de aminoácidos o estructuras tridimensionales que las relacionen, en cambio, sus actividades biológicas permiten que sean agrupadas en dos clases según su papel en los procesos de inflamación e infección. Unas promueven la inflamación y se les

conoce como mediadores pro-inflamatorios, por otro lado, los mediadores anti-inflamatorios suprimen la actividad de las citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, hacer una lista de las citoquinas debe realizarse con el cuidado de que dependiendo del proceso biológico una citoquina puede tener una función distinta.¹⁶

Como se ha mencionado anteriormente, el estímulo LPS juega un papel muy importante en macrófagos. Debido a que una gran parte de desórdenes y enfermedades inflamatorias están relacionadas con una secreción descontrolada de citoquinas, estudiar si hay una inhibición en la transcripción de genes pro-inflamatorios o una estimulación de genes anti-inflamatorios es importante para encontrar alternativas que puedan reducir este tipo de desórdenes. Utilizando los macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS, se puede hacer un estudio *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria a nivel transcripcional de los compuestos aislados.¹⁷

TNF- α es una citoquina proinflamatoria predominante involucrada en los procesos de inflamación, proliferación celular, diferenciación, apoptosis y regulación de otras citoquinas pro-inflamatorias. Es secretada por macrófagos y otras células del sistema inmune (células NK, células T activadas, adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, etc). Puede inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 e IL-6 y está relacionada con diferentes enfermedades como artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, la enfermedad de Crohn y anquilosis al encontrarse en niveles altos.¹⁸

La interleuquina-1 (IL-1) es una citoquina pro-inflamatoria multifuncional (pleiotrópica) que es responsable de varios procesos que incluyen, defensa del organismo, inflamación y respuesta a lesiones. IL-1 se compone de dos isoformas IL-1 α e IL-1 β , sus secuencias de aminoácidos tienen una homología del 26 %, comparten los mismos receptores y muestran la misma actividad biológica. IL-1 es producida por muchos tipos de células, pero de manera predominante por macrófagos cuando son estimulados con virus o componentes

bacterianos como LPS. Numerosos estudios han demostrado que en macrófagos el LPS activa los factores de transcripción NF- κ B, AP-1, NF-IL6 y otras rutas para inducir la transcripción de IL-1. Debido a que IL-1 tiene una fuerte actividad pro-inflamatoria, agentes que reduzcan su producción o actividad pueden ser de importancia farmacológica y clínica.

La interleuquina-10 es una molécula inmunoreguladora crítica del sistema inmune innato. Interfiere con la producción de mediadores pro-inflamatorios (TNF- α , IL-2) y en la secreción de quimiocinas de macrófagos, monocitos y neutrófilos. Además, aumenta la expresión de moléculas o mediadores que amplifican efectos anti-inflamatorios, por ello se dice que pertenece a la familia de las citoquinas con actividades anti-inflamatorias.¹⁹²⁰ Debido a su actividad anti-inflamatoria y efectos inmunosupresores el estudio de IL-10 es importante para una potencial aplicación.

El factor de transformación de crecimiento β (TGF- β , por sus siglas en inglés) es un importante regulador de proliferación celular y diferenciación. Como muchas citoquinas, TGF- β tiene efectos tanto pro- como anti-inflamatorios, funciona como un interruptor biológico al antagonizar o modificar la acción de otras citoquinas o factores de crecimiento. Este mediador es capaz de convertir un sitio activo de inflamación en uno dominado por reparación y resolución de la inflamación, suprime la proliferación y diferenciación de células T y B y limita la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IFN- γ y TNF- α . Actúa como un desactivador de monocitos y macrófagos de una manera similar a la de IL-10.²¹

La quimiotaxis es un proceso celular importante en la respuesta inmune por el cual las células migran a un sitio de interés como sitios de infección, inflamación, lesiones o inclusive cáncer. Las células son guiadas mediante moléculas señalizadoras llamadas quimiocinas.²¹ Las quimiocinas son una familia bastante amplia de citoquinas que inducen la

migración de células como los leucocitos a sitios donde hay una lesión o infección. Algunas son homeostáticas y son producidas constitutivamente, mientras que otras solamente se producen durante una infección o después de un estímulo pro-inflamatorio que activa la migración de leucocitos (neutrófilos y monocitos) por lo que se consideran mediadores de reacciones inflamatorias crónicas y agudas.²²

Se pueden distinguir dos tipos de quimiocinas por la diferencia en las cuatro cisteínas conservadas que forman enlaces de disulfuro (Cys1-Cys3 y Cys2-Cys4). Las quimiocinas CC y CXC se distinguen de acuerdo con la posición de las primeras dos cisteínas, que pueden estar adyacentes (CC) o separadas por un aminoácido (CXC).²³ Las quimiocinas CXC son reclutadoras de neutrófilos mientras que las CC reclutan eficientemente monocitos. En presencia de estímulos pro-inflamatorios como LPS, TNF- α e IL-1 se da una elevación en los niveles de estas citoquinas.²⁴

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1/CCL2, por sus siglas en inglés) es la quimiocina CC más estudiada y caracterizada. Es un fuerte activador de monocitos, basófilos y eosinófilos. La quimiocina CXCL2 o MIP-2 tiene la función de atraer neutrófilos (leucocitos granulares que tienen un papel muy importante en las respuestas inmunes) a los sitios de inflamación. La expresión de ARNm de esta quimiocina se ha observado en respuesta a infecciones microbianas, LPS y estimulación por mediadores pro-inflamatorios como IL-1 y TNF- α . Se producen en distintos tipos de células como macrófagos, células epiteliales, endoteliales entre otras.²⁵

3.6. Inmunomoduladores

Un inmunomodulador se define como cualquier sustancia biológica o no biológica que influye sobre una función específica del sistema inmune o modifica varios componentes de la red inmunoreguladora para generar un efecto sobre una función inmune.²⁶ Los inmu-

nomoduladores pueden suprimir o estimular el funcionamiento del sistema inmunológico mediante diferentes mecanismos. Cuando hay estimulación se les conoce como inmunoes-timulantes, que activan el sistema inmune mediante el aumento de la actividad de sus componentes. Usualmente se usan en vacunas, para el tratamiento o control de infeccio-nes, inmunodeficiencias o cáncer. Por otro lado, los inmunosupresores son sustancias que pueden reducir la habilidad del sistema inmune mediante la inhibición de la activación o disminuyendo la actividad de sus componentes. Muchos de estos agentes son utilizados en el trasplante de órganos o enfermedades autoinmunes.²⁷ Los compuestos inmunomodula-dores pueden ser sintéticos u obtenidos de la naturaleza, por ejemplo la ciclosporina (ver figura 3.7), es un agente inmunosupresor obtenido naturalmente del hongo *Tolypocladium inflatum* que ha ayudado en el trasplante de órganos al prevenir el rechazo de órganos.

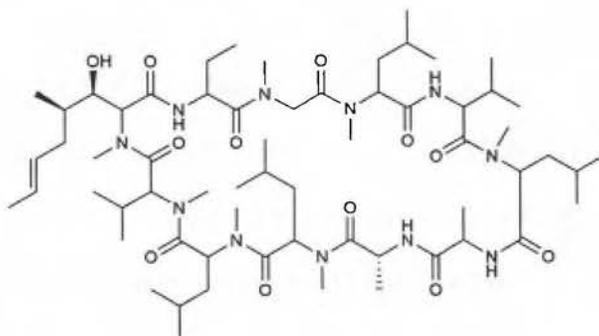


Figura 3.7: Estructura molecular del agente inmunosupresor ciclosporina.

La investigación científica en el campo de la fitoquímica siempre ha sido una fuente importante de sustancias activas para la terapia clínica debido a que ofrece una gran diversidad química, con una actividad farmacológica variada. Por ello la investigación en productos naturales es importante para el descubrimiento de nuevas drogas y sustancias para nuestro beneficio.²⁸ Ejemplo de ello son la gran variedad de compuestos inmunomoduladores que tienen origen vegetal, por ejemplo las especies *Azadirachta indica*, *Panax ginseng*, *Withania somnifera*, *Picrorrhiza kurroa*, *Glycyrrhiza glabra*, entre muchas otras,

presentan una actividad interesante como inmunoestimulantes, inmunosupresores y anti-inflamatorios.²⁶ Esto abre una gran oportunidad para la investigación en Costa Rica por su gran biodiversidad para el descubrimiento de nuevos compuestos y estructuras con actividad interesante. La biodiversidad en plantas en Costa Rica está estimada casi en 10 000 especies,²⁹ de las cuales se puede hacer estudios para el descubrimiento de nuevos compuestos que puedan tener una incidencia importante en la modulación del sistema inmune.

3.7. Familia Piperaceae

Las plantas de la familia Piperaceae son hierbas, arbustos, o árboles, a veces subes-candentes o lianas, terrestres, hermafroditas, pubescentes con tricomas simples, multicelulares, generalmente punteados; tallos con los nudos a menudo prominentes, a menudo con profilos solitarios, laterales; estípulas ausentes. Hojas simples, alternas u opuestas, enteras, a menudo aromáticas al estrujarse, sésiles a pecioladas, el pecíolo con frecuencia decurrente y abrazado al tallo.

Esta familia se reconoce fácilmente por sus hojas simples, generalmente punteadas, con idioblastos y a menudo aromáticas al estrujarse, con la lámina entera y (a menudo asimétrica) en la base sus inflorescencias generalmente espigadas y densamente floreadas, con el raquis usualmente más o menos carnoso; y sus flores diminutas, sin perianto y con el ovario unilocular y uniovulado. Las especies herbáceas (principalmente *Peperomia*) son frecuentemente epifíticas, mientras las especies leñosas (*Manekia* y *Piper*) se destacan por sus tallos con los nudos a menudo engrosados y prominentes. Es una familia tropical con 5 géneros y más de 3000 especies.³⁰³¹

3.7.1. Género *Piper*

El género *Piper* (Piperaceae) es un grupo Pantropical con casi 2000 especies, constituye un importante elemento en los bosques montañosos. Es uno de los diez géneros de angiospermas con más especies encontradas en los trópicos.³² La mayoría de las especies de *Piper* están restringidas a altitudes que van desde 0 a 2500 msnm y pocas ocurren por arriba de los 3000 msnm. Este género tiene su mayor diversidad en las regiones neotropicales. Los Andes, zonas bajas de Centro América y el centro de la Amazonia, son considerados como los centros de mayor riqueza para este género en los Neotrópicos.³³ Se reconoce por su hábito generalmente leñoso, tallos con los nudos prominentes y con perfiles, pecíolos generalmente con márgenes estipuliformes más o menos prominentes y flores con 2-5 estigmas. Las hojas son alternas con un marcado dimorfismo con respecto al tipo de eje. *Piper* es uno de los géneros más abundantes y de diversos linajes de angiospermas en el trópico. En el manual de plantas de Costa Rica se reconocen 331 especies distintas que se describen, pero se recalca que todavía falta por describir una veintena de especies más.³¹

3.7.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica para este género es la siguiente:³⁴

Reino: Plantae (Plantas)

Subreino: Tracheobionta (Plantas vasculares)

Filo: Magnoliophyta (Plantas con flores)

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledoneas)

Subclase: Magnoliidae

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

3.7.3. Fitoquímica del género *Piper*

La fitoquímica de las especies de *Piper* ha sido explorada a nivel mundial y los estudios han llevado al aislamiento de una gran cantidad de compuestos biológicamente activos como alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, esteroides, kawapironas, piperólidos, chalconas, dihidrochalconas, flavonas y flavononas.³⁵ Por ejemplo, se han aislado los neolignanos eupomatenoide-5 (1), eupomatenoide-6 (2), y conocarpan (3) de *Piper regnellii* con actividad contra *Trypanosoma cruzi* con valores de IC₅₀ de 7.0, 7.5 y 8.0 µg/mL respectivamente.³⁶ En otros estudios se han aislado de *Piper nigrum*, alcaloides que exhiben propiedades anti-inflamatorias como chabamida (4), pellitorina (5), retrofractamida A (6), isopiperoleina B (7) y 6,7-dehidrobrachiamida B (8) al inhibir la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS con valores de IC₅₀ de 6.8, 14.5, 30.2, 23.7 y 38.5 µmol/L respectivamente.⁵ De *Piper kadsura* se han aislado los neolignanos piperkadsina A (9), piperkadsina B (10), futoquinol (11), piperlactama S (12) y N-p-coumaroil tiramina (13) quienes exhiben una potente inhibición de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) en neutrófilos humanos con valores de IC₅₀ de 4.3 ± 1.0, 12.2 ± 3.2, 13.1 ± 5.3, 7.0 ± 1.9, y 8.4 ± 1.3 µmol/L.³⁷

La pipartina (14) es un alcaloide encontrado en varias especies de Piperáceas y se ha demostrado que tiene diferentes actividades interesantes como: propiedades anti-cancerígenas, muestra beneficios para el tratamiento de infecciones de parásitos y propiedades anti-inflamatorias en el sistema nervioso central. Sus efectos se han caracterizado mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) y de prostaglandina E2, inducidos por lipopolisacárido (LPS). También se ha visto que reduce la expresión de la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y la ciclooxigenasa-2, así como citoquinas pro-

inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés), la interleuquina-6 (IL-6), y también mediante la supresión de la ruta de señalización de NF- κ B.

Se han aisaldo hidroquinonas preniladas y ácidos benzoicos 4-hidroxi-prenilados (15-20) de las frutas de *P. crassinervium* que tiene capacidad de suprimir los radicales de DPPH y de quimioluminiscencia del luminol, usando ABAP como fuente de radicales peróxilo y también pueden inhibir la peroxidación lipídica en modelos de membrana, lo cual muestra una capacidad anti-oxidante de estos compuestos.³⁸

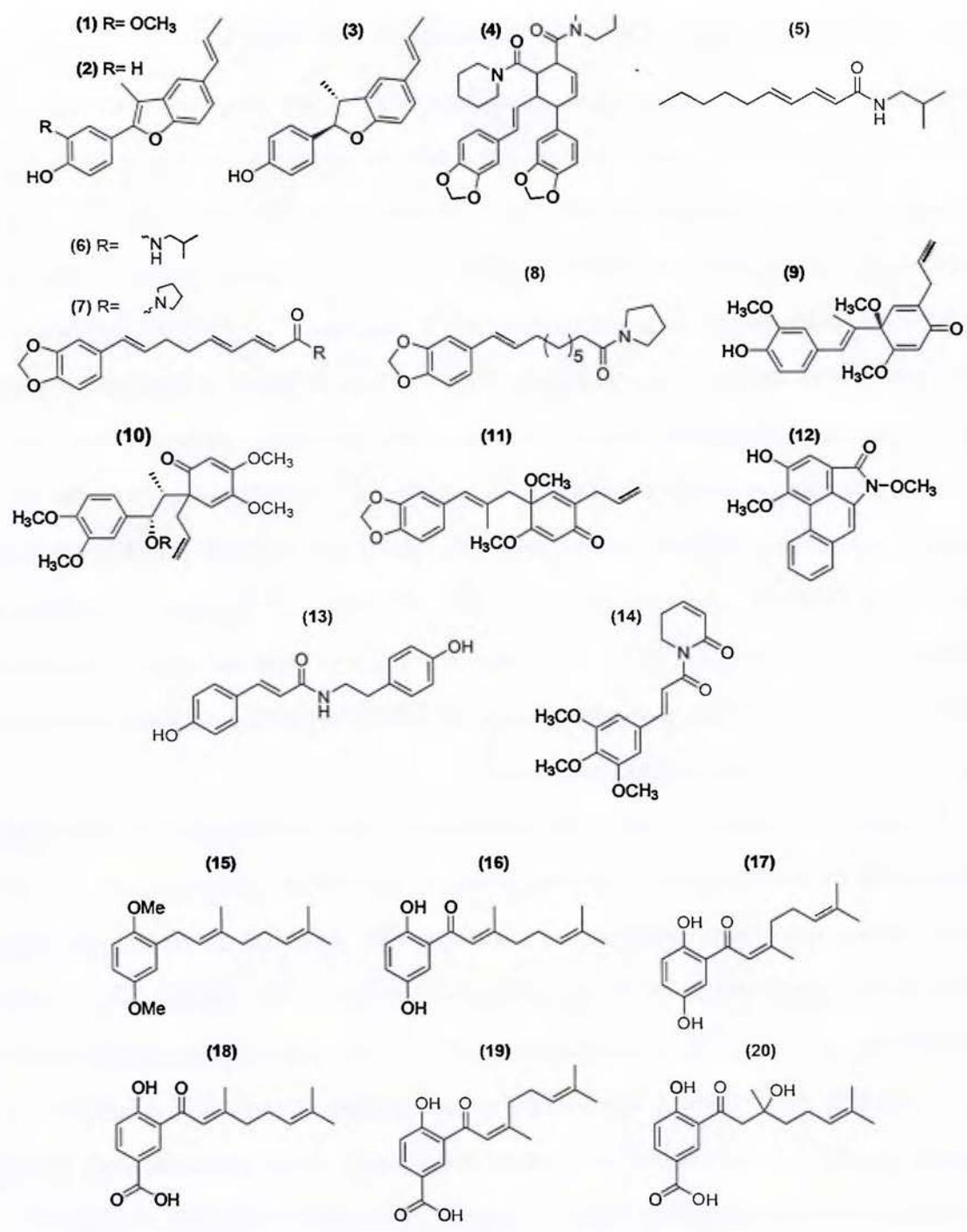


Figura 3.8: Compuestos con diferentes actividades biológicas aislados de varias especies del género *Piper*.

3.7.4. Aspectos generales de actividad biológica

Las especies de *Piper* son plantas aromáticas usadas como especias en la cocina, pero sus metabolitos secundarios han mostrado tener efectos biológicos sobre la salud humana. Son plantas ricas en aceites esenciales que se pueden encontrar en las frutas, semillas, hojas, ramas y tallos. Algunas muestran perfiles químicos simples, mientras que otras poseen una gran diversidad de metabolitos como *P. nigrum*, *P. betle* y *P. auritum*.

En medicina tradicional, las especies de *Piper* se han utilizado a nivel mundial para el tratamiento de enfermedades tales como: problemas urológicos, dolencias estomacales, cicatrización, agentes anti-inflamatorios y anti-piréticos.³⁹ Extractos de los tallos de *P. arborescens* muestran actividad contra cultivos de células KB y en cultivo celular de leucemia linfocítica P-388. En Jamaica, las especies *P. aduncum* y *P. hispidium* se consideran plantas para el remedio de dolor de estómago y como repelente de insectos respectivamente. La planta *P. amalago*, que se distribuye de México a Brasil, se emplea para aliviar los dolores de pecho y como anti-inflamatorio.³⁵

De las plantas del género *Piper* también se ha encontrado otros tipos de actividades biológicas como: actividad anti-microbiana para el tratamiento de periodontitis crónica, actividad contra patógenos gástricos como *Helicobacter pylori* al disminuir entrada de la toxina de este patógeno a las células gástricas epiteliales. En adición a las actividades previamente mencionadas de las plantas de *Piper*, diferentes investigaciones también han indicado que estas plantas son activas como agentes anti-diabéticos, diuréticos y anestésicos locales.³⁹ La actividad ante varios protozoarios de importancia para la salud pública como *Leishmania*, *Plasmodium* y *Trypanosoma* también ha sido estudiada. Los compuestos aislados más activos se han encontrado en especies como *P. heterophyllum* y *P. aduncum* siendo compuestos de ácidos benzoicos prenilados los responsables de esta

actividad. También se ha reportado actividad insecticida contra *Tenebrio molitor* y *Sporoptera frugiperda* por *P. aduncum* y *P. hispidinervum*,⁴⁰ contra *Musca domestica* por *P. aduncum*, contra el *Aedes aegypti* por *P. krukoffi* y *P. marginatum*.⁴¹

La mayoría de esta información se obtiene a partir de ensayos *in vitro*, mientras que los ensayos *in vivo* y toxicológicos son algo limitados. A pesar de ello, se muestra que este género de plantas tiene un potencial bastante amplio y que los mecanismos detrás de sus actividades es un campo por explorar.³⁹

3.7.5. *Piper garagaranum* C. DC.

Piper garagaranum C. DC. (ver figura 3.9) es una hierba, sufrútice o arbusto que va de 0.1 a 1.2 m de altura. En el campo se reconoce esta especie por sus láminas foliares de verdes nítidos a azuladas, inequiláteras en la base, membranáceas y más o menos abolladas, espigas erectas, blanco verdoso a verdes, cortas y gruesas, y frutos globosos y apiculados en el ápice. Se encuentra en el bosque húmedo, muy húmedo y pluvial, bosques primarios y perturbados, claros de bosques y cacaotales.³¹ Se ha encontrado desde Nicaragua hasta Colombia, siendo Costa Rica el país con más plantas reportadas según el Museo Nacional de Historia Natural Smithsonian y no existen hasta la fecha estudios fitoquímicos reportados para esta planta, por lo que es un buen candidato para encontrar nuevos compuestos con actividad biológica.



Figura 3.9: A) y D) *Piper garagara* C. DC. encontrada en la literatura.⁴² B) y C) *Piper garagara* recolectada en junio del 2019, Horquetas de Sarapiquí, Costa Rica.

3.8. Fundamentos de los ensayos biológicos

La cuantificación de óxido nítrico producido por macrófagos activados permite determinar la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico con el fin de evaluar propiedades anti-inflamatorias de extractos o compuestos puros. Esta cuantificación se puede realizar mediante la reacción de Griess que se utiliza como un método para la determinación de nitrito para una gran variedad de fluidos biológicos y que se puede acoplar a técnicas de cultivo celular. Por otro lado, el estudio de la expresión de genes en cultivo celular se utiliza para hacer estudios de actividad de un compuesto sobre líneas celulares mediante la medición de diferentes genes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Este se realiza mediante el uso de PCR en tiempo real y su fundamento junto con la reacción de Griess se explican en a continuación.

3.8.1. Reacción de Griess

Desde el descubrimiento de la ruta L-arginina/óxido nítrico (L-Arg/NO) en 1987, la reacción de Griess es la manera más frecuente para la cuantificación de NO y productos de oxidación como nitrito y nitrato, en una gran variedad de fluidos biológicos como en muestras de sangre y orina. La reacción de Griess es específica para nitrito y la simplicidad de la reacción por ser una técnica analítica, fácil y poco costosa, ha atraído la atención de muchas disciplinas dedicadas a la cuantificación de NO.⁴³

Johann Peter Griess (1829-1888) fue un químico alemán que reportó la síntesis de un pigmento azo utilizando diazobenceno y naftilamina. Para mejorar la solubilidad en agua del compuesto, el diazobenceno fue reemplazado por el ácido sulfónico del diazobenceno preparado del ácido sulfanílico. En la reacción de diazotización el nitrito reacciona con el ácido sulfanílico bajo condiciones ácidas, para formar el ion diazonio. El ion hace una reacción de acoplamiento con α -naftilamina para formar un pigmento azo, soluble en agua (ver figura 3.10).⁴³

Existen variantes de esta reacción y los reactivos más usados son la sulfanilamida y la N-(1-naftil) etilendiamina (NED), conocidos como los reactivos de Griess. La absorptividad molar del pigmento resultante del acoplamiento azo entre los reactivos de Griess es $41000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 540nm. El uso de NED ofrece varias ventajas sobre otros reactivos en términos de reproducibilidad, rapidez de acoplamiento, mayor sensibilidad, aumento de solubilidad en medio ácido del compuesto azo y una independencia del color con el pH en un rango de 1-2. Esta reacción modificada se utiliza mucho como el ensayo de Griess en análisis cuantitativos y es un método estándar para la determinación de nitritos en agua en Europa como un método espectrométrico.

El mecanismo de reacción consta de una primera reacción entre la sulfanilamida y el ion

nitrosonio formado *in situ* de la reacción entre el ion nitrito y el HCl para generar la sal de diazonio en un mecanismo de diazotización. Posteriormente se lleva a cabo una sustitución electrofílica aromática en donde la sal de diazonio funciona como electrófilo y la amina aromática (NED) como nucleófilo en un proceso que se conoce como acomplamiento azo en la posición *para* con respecto al grupo amino en la amina (NED). (ver figura 3.11).

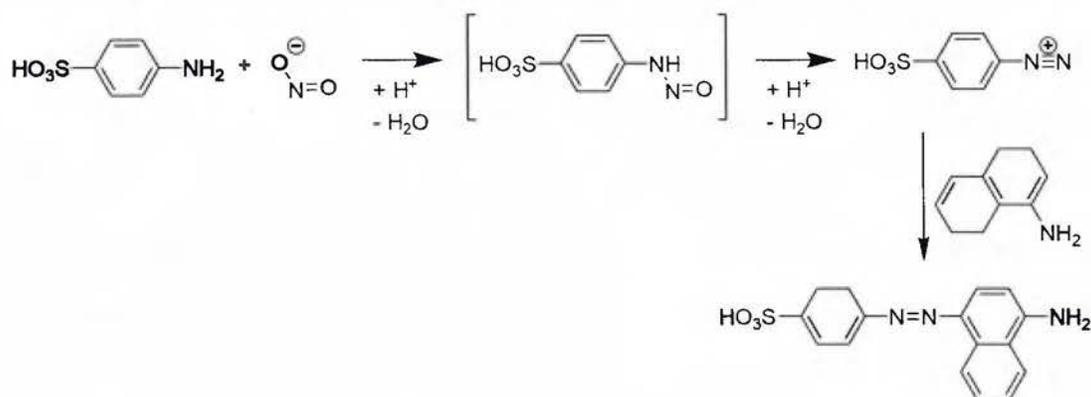


Figura 3.10: Reacción de Griess reportada originalmente. Bajo condiciones ácidas el nitrito reacciona con el ácido sulfanílico para formar el catión diazo, el cual acopla con la α -naftilamina en posición *para* formando el pigmento azo.

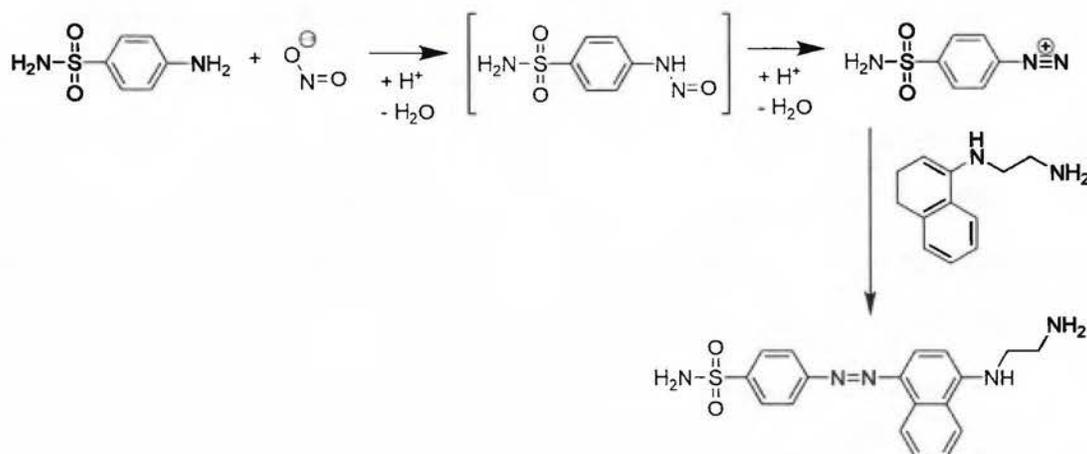


Figura 3.11: Reacción de Griess modificada y usada actualmente. Bajo condiciones ácidas el nitrito reacciona con la sulfanilamida para formar el catión diazo, el cual acopla con la N-(1-naftil) etilendiamina en posición *para* formando el pigmento azo.

3.8.2. Reacción de MTT para evaluar viabilidad celular

Los ensayos colorimétricos que usan la sal de tetrazolio, también llamados MTT (por sus siglas en inglés) son muy utilizadas para la evaluación de citotoxicidad, viabilidad celular y estudios de proliferación en la biología celular. El MTT en disolución acuosa tiene un color amarillo intenso que, en un proceso de reducción por deshidrogenasas y agentes reductores presentes en células metabólicamente activas, forman la sal de formazán azul-violeta insoluble en agua(ver figura 3.12).⁴⁴

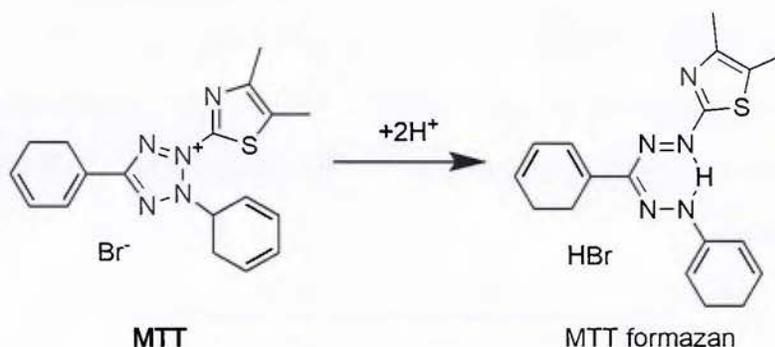


Figura 3.12: Reacción de reducción del MTT a la sal de formazán.

3.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés) es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los ochentas.⁴⁵ La PCR es una técnica valiosa para la amplificación de una pequeña cantidad de ácidos nucleicos o para aumentar la proporción de una secuencia particular de ácidos nucleicos en una mezcla de moléculas de ADN o ARN. El uso de esta tecnología evita la necesidad de tomar muestras grandes de tejidos para obtener suficiente material genético para secuenciar o clonar.⁴⁶

En el proceso de una reacción en cadena de la polimerasa una muestra de ADN desnaturalizada por calor es incubada con una ADN polimerasa, dNTPs, y oligonucleótidos cuyas secuencias rodean el segmento de ADN de interés con el fin de dirigir a la ADN polimerasa a sintetizar hebras complementarias. Múltiples ciclos de este proceso duplican la cantidad de ADN en un proceso que se convierte exponencial. En cada ciclo las dos hebras de ADN se separan mediante calor a 95 °C, la temperatura luego disminuye para permitir la hibridación de los primers a sus segmentos complementarios en el ADN y luego la ADN polimerasa dirige la síntesis de las nuevas hebras (ver figura 3.13). Se hace uso de ADN polimerasas termoestables como la Taq polimerasa que se deriva de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. El proceso por lo tanto se lleva a cabo de manera simple en equipos que pueden variar la temperatura de manera precisa y automática conocidos como termocicladores.

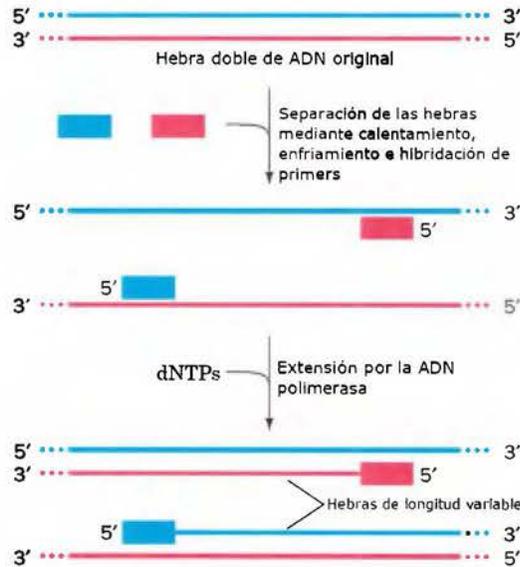


Figura 3.13: Reacción en cadena de la polimerasa. En cada ciclo las hebras se separan mediante calor, la hibridación con primers se lleva a cabo cuando la temperatura disminuye y la ADN polimerasa lleva a cabo la extensión de las nuevas hebras. Imagen tomada y modificada de [46].

Uno de los logros más importantes en el uso de PCR fue la introducción del concepto de monitorear la amplificación del ADN en tiempo real utilizando fluorescencia. En PCR en tiempo real, la fluorescencia es medida después de cada ciclo y la intensidad de la señal de fluorescencia refleja momentáneamente la cantidad de ADN amplificado en la muestra en un tiempo específico. En los ciclos iniciales, la fluorescencia es muy baja para ser distinguida del ruido, sin embargo, el punto en el cual la intensidad de fluorescencia aumenta por encima del nivel detectable corresponde de manera proporcional, al número inicial de moléculas de ADN plantilla en la muestra. Este punto se le llama el ciclo de cuantificación y permite la cuantificación absoluta de una secuencia de ADN específico en la muestra de acuerdo con una curva de calibración construida con diluciones seriadas de las muestras estándar con concentraciones o número de copias conocidas.⁴⁷ Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar electroforesis posteriores.

Los ensayos de PCR en tiempo real son entre 10 000 y 100 000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, 1 000 veces más sensibles que la hibridación por Dot blot y pueden detectar diferencias de una sola copia de ADN.⁴⁵ Esta técnica se utiliza mucho para medir la expresión de genes de interés en un gran espectro de muestras que provienen de diferentes fuentes como tejidos, sangre, cultivos celulares de diferentes orígenes, entre otros.

Para emplear una PCR en tiempo real además de los reactivos utilizados en una PCR sencilla, es necesario emplear un fluoróforo. Cuando la muestra es ARNm, en lugar de ADN, es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa del ARNm a ADN copia (ADNc) antes de que se aplique la PCR en tiempo real. A este ensayo se le conoce como retrotranscripción acoplada a PCR, y es catalizado por una transcriptasa reversa de origen viral. Finalmente se realiza la amplificación del ADN o ADNc en un

termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado.

El equipo utilizado consta de un termociclador, un detector de fluorescencia, un hardware y software para la captura y análisis de los datos, respectivamente. El termociclador es un equipo que es capaz de mantener temperaturas uniformes en las muestras y puede realizar transiciones de temperatura rápidas entre etapas del ciclo de PCR. El sistema óptico consiste en una fuente de energía como una lámpara de tungsteno ó un láser que es la encargada de excitar los fluoróforos y un sistema de detección que incluyen filtros, multiplicadores y fotodetectores. (ver figura 3.14)

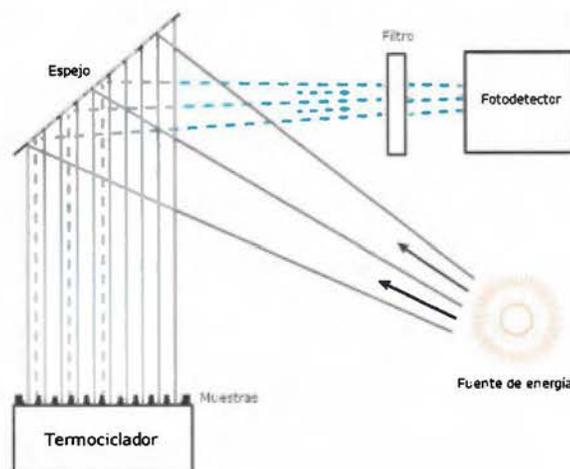


Figura 3.14: Esquema de un equipo de PCR en tiempo real. Las muestras son excitadas en el termociclador mediante una fuente de energía, la fluorescencia es reflejada y pasa por un filtro a un fotodetector.

Existen dos métodos para la detección que se utilizan de manera frecuente. El primero es el uso del SYBR Green que es un fluoróforo capaz de intercalarse en el surco menor del ADN, que produce una fuerte señal cuando se incorpora en la hebras doble de ADN. Debido a que la plantilla de ADNc usada para el ensayo es de hebra simple, el SYBR Green no se puede enlazar y por lo tanto este fluoróforo selectivamente detecta el producto de

doble hebra de la amplificación (amplicon). SYBR Green tiene una alta sensibilidad y es el método más barato que hay disponible, sin embargo, presenta algunas limitaciones que se tienen que tomar en consideración. Una de las consideraciones es el diseño de los primers a utilizar, con el fin de evadir la asociación entre ellos que generaría una doble hebra de ADN al que el SYBR Green puede intercalarse. Otra es que la especificidad de la reacción de PCR debe de ser alta, debido a que productos no específicos también contribuyen a la señal final. Por ello, aunque el uso de este fluoróforo es bueno como método, se necesita de una buena optimización para obtener resultados confiables que se puede evaluar mediante curvas de disociación para monitorear el producto de PCR.⁴⁸

El segundo método es mediante el uso de sondas fluorescentes para la detección. Estas sondas son diseñadas para hibridarse a una secuencia específica dentro del amplicon. En este método, la generación de productos no específicos o dímeros de primers es un problema que se disminuye en comparación con el SYBR Green. El principio detrás de la detección con estas sondas es el siguiente: la sonda está enlazada a un marcador fluorescente en un extremo y un apagador (quencher en inglés) en el otro que no permite que fluoróforo emita fluorescencia. Por lo tanto, sondas libres no pueden emitir fluorescencia, pero cuando el fluorocromo se libera del quencher, debido a la degradación de la sonda al incorporarse al amplicon durante la reacción de PCR, la fluorescencia puede ser detectada y es proporcional a la cantidad del producto. Este tipo de sondas permite realizar experimentos de multiplexing para la determinación simultánea de varios genes o productos en una muestra mediante el diseño de diferentes sondas.

Justificación

Las infecciones persistentes e inflamaciones crónicas están asociadas a un 15-20% de las muertes por cáncer a nivel mundial y en el mundo treinta millones de personas consumen diariamente anti-inflamatorios no esteroideos, que es un grupo de medicamentos muy relevantes gracias a su versatilidad como analgésicos y anti-inflamatorios.^{49,50,51} Sin embargo, se atribuyen importantes complicaciones debido a su consumo. Por ejemplo, se han reportado hemorragias digestivas, úlcera sintomática e insuficiencia renal sobre el tracto superior gastrointestinal.⁵² Debido a esta problemática, es importante la búsqueda de nuevos compuestos más seguros y efectivos que posean propiedades anti-inflamatorias.⁵³ Por ello, en los últimos años ha crecido el interés por obtener nuevas sustancias más específicas y con menores efectos secundarios para modular el sistema inmune y prevenir enfermedades relacionadas con este.⁵⁴

Los productos naturales han contribuido enormemente a las terapias inmunomoduladoras y desde hace mucho tiempo las medicinas naturales se han usado como tratamientos para enfermedades. Las plantas se pueden considerar como fabricas biosintéticas, no solamente para compuestos como carbohidratos, lípidos y proteínas pero también para una gran variedad de compuestos que pueden ejercer efectos fisiológicos que conocemos como metabolitos secundarios.⁵⁴

Los compuestos bioactivos de las especies de *Piper* pueden jugar un papel muy importante como agentes terapéuticos en el descubrimiento de nuevas drogas. Este género es el más grande dentro de la familia Piperaceae (*Macropiper*, *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* y *Manekia*) y tiene un gran número de usos tradicionales y medicinales.⁵⁵ Los constituyentes fitoquímicos obtenidos de estas diferentes especies de plantas se caracterizan por

la producción de amidas, ácidos benzoicos, cromenos, terpenos, fenilpropanoides, liganos, neolignanós, fenoles, flavonoides, diferentes alcaloides y compuestos prenilados.⁵⁶ Al considerar el vasto potencial terapéutico de este género de plantas, una investigación de una especie como *P.garagaranum* C. DC., que ha mostrado actividad anti-inflamatoria interesante en estudios realizados por el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) y el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), es una oportunidad para el estudio y el aislamiento de compuestos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias.

En este trabajo se pretendió estudiar la actividad inmunomoduladora y anti-inflamatoria de *P. garagaranum* C. DC, que no posee estudios fitoquímicos hasta la fecha. y aislar los compuestos responsables de esta actividad. Para ello se utilizó técnicas de cromatografía tanto preparativa (cromatografía en columna) como analítica (en capa delgada), cromatografía líquida de alta presión, técnicas espectroscópicas y espectrométricas que permitieron aislar y caracterizar los compuestos, así como emplear bioensayos para guiar la separación y estudiar la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados.

La investigación se realizó a cabo en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) y en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Centros de investigación en donde se encuentran todas las herramientas para llevar a cabo la extracción, fraccionamiento y caracterización de los compuestos bioactivos mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, la capacidad de emplear ensayos biológicos en líneas celulares para guiar el fraccionamiento y hacer los estudios de posibles mecanismos de acción de los compuestos separados.

Objetivos

1. Objetivo general

- Caracterizar química y biológicamente compuestos inmunomoduladores de la especie *Piper garagaranum* C. DC.

2. Objetivos específicos

- Aislar compuestos que posean actividad inmunomoduladoras de la planta *P. garagaranum* C.DC.
- Elucidar la estructura de los compuestos con actividad inmunomoduladora de la planta *P. garagaranum* C. DC.
- Determinar la actividad biológica de los compuestos aislados.
- Estudiar los posibles mecanismos de modulación del sistema inmune de los compuestos activos aislados de la planta *P. garagaranum* C. DC.

Reactivos y equipos

6.1. Reactivos

Los reactivos y sustancias químicas utilizadas se detallan en la siguiente tabla.

Cuadro 6.1: Lista de reactivos utilizados en el trabajo.

Reactivo	Marca
Etanol	Emsure
Hexano	LiChrosolv
Metanol	LiChrosolv
Acetonitrilo	Sigma
DMEM	Sigma
Diaion HP20	Supelco
Diaion HP20SS	Supelco
Discovery DPA - 6S	Supelco
Suero fetal bovino	Fischer 14-503F
MTT	Sigma
DMSO	Sigma
Partenolido	Sigma
100 UI/mL Penicilina, 100ug/mL Streptomina	Sigma
Kromasil 10 μ C18	AKZO NOBEL Eka Chemicals
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit	Thermo Scientific
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems

6.2. Equipos

Los equipos utilizados en esta investigación se detalla a continuación:

Cuadro 6.2: Lista de equipos utilizados en el trabajo.

Reactivo	Marca
Incubadora	Heraeus INSTRUMENTS
Cámara de flujo laminar	Hitachi
Microscopio Primo Vert	ZEISS
Columna de HPLC analítico Luna 5 μ C18 100Å	Phenomenex
Columna de HPLC preparativo Zorbax Eclipse XDB-C18	Agilent
Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) 400MHz	Bruker
Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) 600MHz	Bruker
HPLC Agilent 1200	Agilent
HPLC preparativo Agilent Technologies 1260 Infinity II	Agilent
UPLC/MS	Acquity-Synapt Waters
Lector de microplacas MRX revelation	DYNEX Magellan Biosciences
Centrifuga 5430	Eppendorf
Citómetro de flujo	Guava Techonologies
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems

Métodos

7.1. Recolección e identificación de *Piper garagara-num* C. DC.

Se recolectan 240 g de diferentes individuos de la especie en su totalidad en julio del 2019 en Horquetas de Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. La planta fue autenticada e identificada por el biólogo José Miguel Chaves-Fallas según el Manual de Plantas de Costa Rica. Un voucher de la especie (Sáenz 1) fue depositado en el herbario Luis A. Fournier Origgí (USJ) de la Universidad de Costa Rica.

7.2. Extracción y aislamiento

La planta recolectada se deja secar por 24 h en estufa a 40 °C y se tritura en molino. El peso seco y molido (48.89 g) se extrae con EtOH absoluto mediante sonicación (400 mL x 30 min x 3, BRANSON 3800). Los extractos fueron filtrados, combinados y evaporados bajo presión reducida y SpeedVac, obteniendo un extracto crudo verde (1.80321g). El extracto crudo se disuelve en 40 mL de 70% EtOH y se realizan extracciones líquido-líquido con 5 mL de hexano para remover grasas y clorofilas hasta observar que el hexano sale limpio, la fase acuosa (Pg-Aq) y hexánica (Pg-FH) se concentran y se determina el peso (ver cuadro 7.1). El extracto desengrasado (0.5429 g) reconstituido en MeOH y adsorbido en una cabeza de columna de 18 mL de HP20 y se limpia en una columna flash con 45 mL de HP20SS, 9.0 g de poliamida (DPA-6S). A la columna se le hacen lavados con 350 mL de agua para la eliminación de sales y azúcares, se deja secar la columna cinco minutos y posteriormente se hace eluir con 350 mL de EtOH recogiendo el extracto

depurado (Pg-DEP) que es secado a presión reducida y SpeedVac.

Cuadro 7.1: Recuperaciones de masa obtenidas en el proceso de depuración del extracto crudo.

Fracción	Peso (g)
Pg-FH	1.4673
Pg-Aq	0.5429
Pg-DEP	0.4468

Se toman 0.4468 g de depurado y se someten a una cromatografía líquida al vacío (VLC, por sus siglas en inglés) usando una fase reversa (Kromasil C18 10 μ). Se hace una cabeza de columna en relación 1 a 5 con 2.40 g de la misma fase en una columna de Di=2.5 cm y L=5 cm empacada al vacío. El gradiente de elución se empieza desde 90 % H₂O hasta 100 % MeOH, con incrementos del 5% pasando dos veces 25 mL del mismo gradiente. Al final se hace pasar una fase móvil de MeOH:IPA (80:20) para asegurar de que ningún componente se quede retenido en la columna. Las fracciones se monitorean por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) como se observa en la figura 7.1, revelando con anisaldehído y obteniendo 16 fracciones en total.

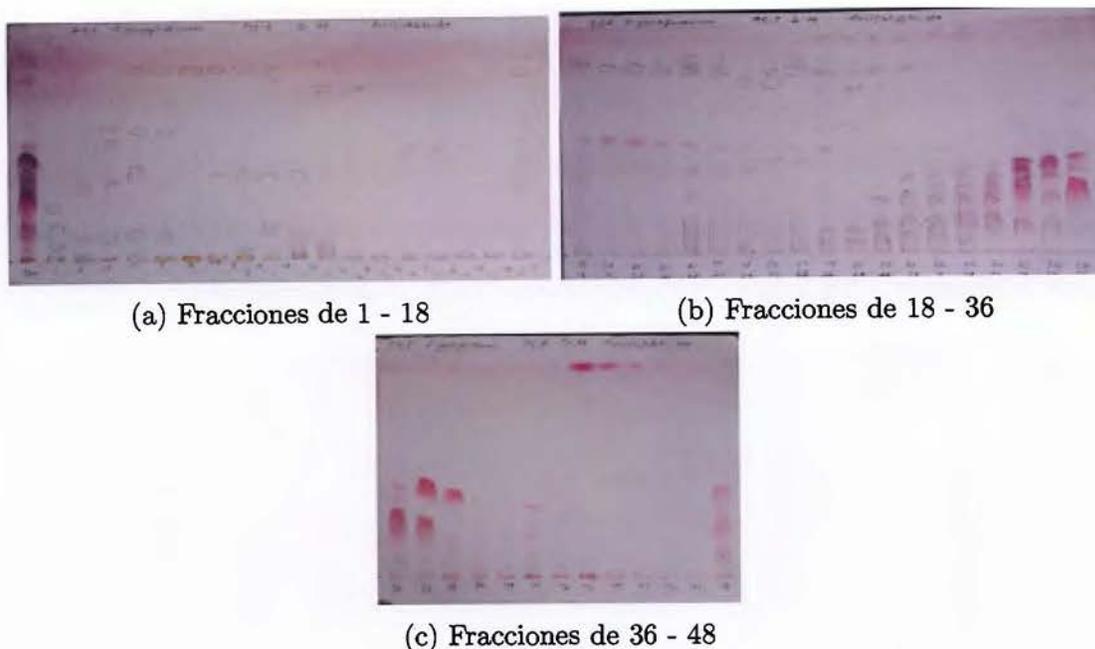


Figura 7.1: Monitoreo de la separación del depurado por VLC en fase reversa revelado con anisaldehído en placas de cromatografía en capa fina. (Fase móvil 95:5 CH_2Cl_2 :MeOH)

A partir de los ensayos de actividad biológica, se seleccionaron las fracciones Pg-DEP-36 y Pg-DEP-37, que se someten a una separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés). Se realizan corridas cromatográficas por HPLC en un equipo Agilent 1200, utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) para obtener el mejor método de separación utilizando fases móviles de CH_3CN - H_2O , una columna Phenomenex, Luna 5μ C18, SN 601229-25 (250x4.60mm) e inyecciones de 10-30 μL de las fracciones a una concentración de 1 mg/mL. Seguido a la optimización de las corridas, se escala a HPLC semipreparativo utilizando un equipo Agilent Technologies 1260 Infinity II con detector de arreglo de diodos (DAD) y una columna Agilent, Zorbax Eclipse XDB-C18 semi-preparativa (9.4x250mm) 5μ (SN USSY004200). Se hacen inyecciones de 1mL para separar 5 mg por corrida de las fracciones Pg-DEP-36 y Pg-DEP-37 (0-25 min 20:80 H_2O : CH_3CN , 25-27 min 10:90 H_2O : CH_3CN , 27-40 min 0:100

H₂O:CH₃CN, H₂O 0.1 % ácido fórmico) para obtener los compuestos **1** ($t_R = 16.38\text{min}$) y **2** ($t_R = 18.51\text{min}$)(ver figura 7.2). La pureza de ambos compuestos aislados se determina por UHPLC con detector de arreglo de diodos dando porcentajes de 94 % y 96 % de pureza respectivamente para los compuestos **1** y **2** (Ver Anexo I). Los rendimientos obtenidos fueron de 27.5 mg y 9.3 mg para los compuestos **1** y **2** respectivamente.

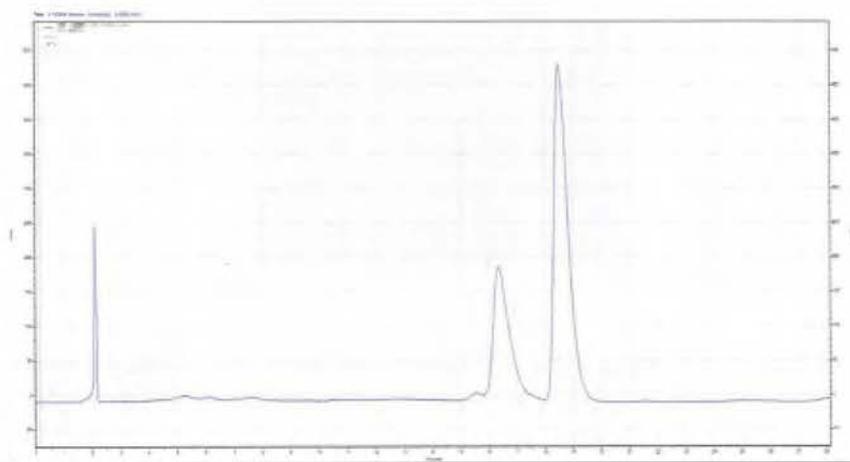
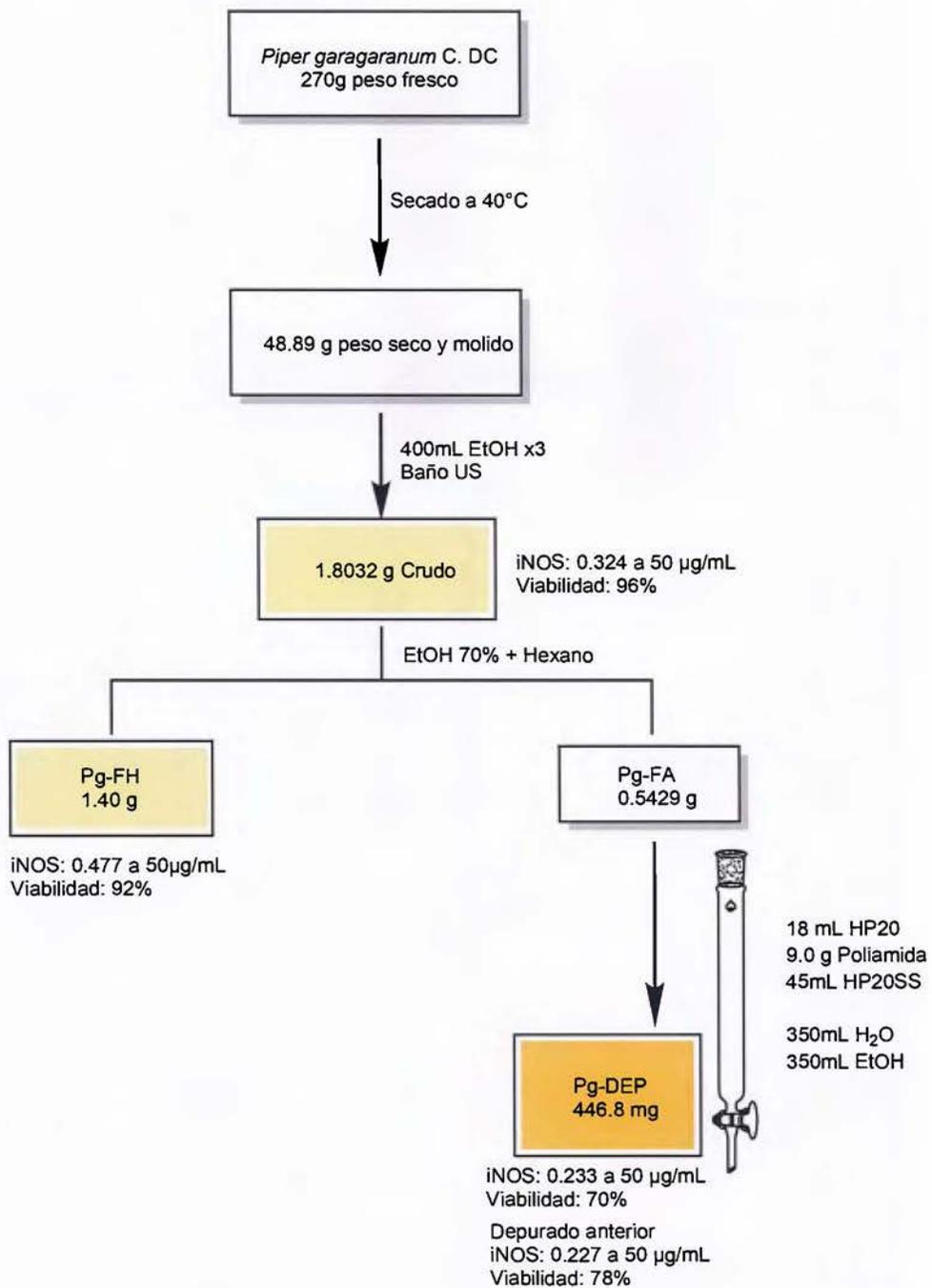
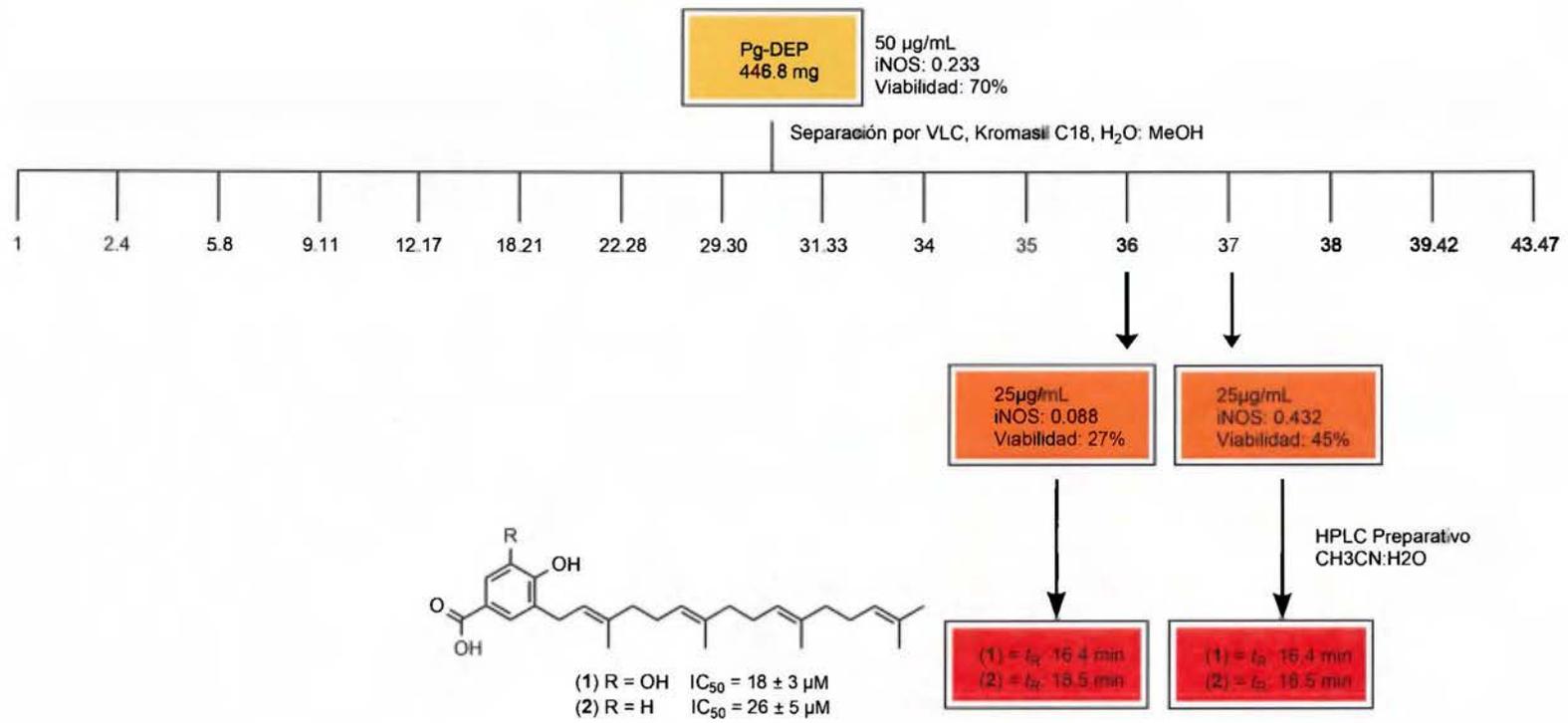


Figura 7.2: Cromatograma de la separación por HPLC semi-preparativo de las fracciones Pg-DEP-36 y Pg-DEP-37.

7.2.1. Esquema de separación





7.3. Caracterización y elucidación estructural

Los compuestos **1** y **2** fueron aislados del fraccionamiento guiado por bioensayos del depurado de *P.garagaranum* C. DC. Las estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos prenilados (figura 7.3) fueron elucidadas utilizando espectros en una y dos dimensiones de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas de alta resolución y mediante la comparación con lo reportado en la literatura.⁵⁷

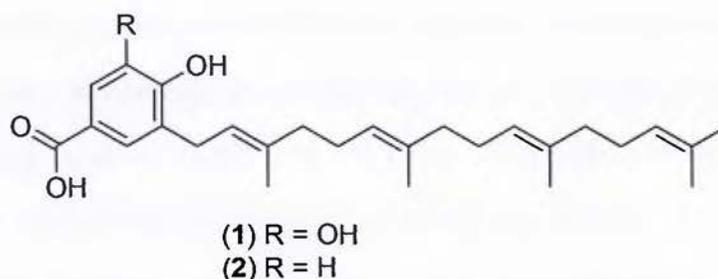


Figura 7.3: Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos prenilados aislados de *P. garagaranum*.

7.4. Bioensayos

7.4.1. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y viabilidad celular

Se cultivaron células de la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y 1 % penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ y en atmósfera humidificada. Cada fracción por probar se disolvió en DMSO a una concentración final de 10 mg/mL y cada compuesto a una concentración de 10 mmol/L. Las concentraciones finales en los experimentos se obtienen realizando las diluciones adecuadas con medio de

cultivo.

La actividad anti-inflamatoria se evaluó por medio del efecto de las fracciones o compuestos sobre la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), determinando la concentración relativa de óxido nítrico en el sobrenadante de las células mediante el método de Griess, y comparándola con la concentración de NO en células que solamente fueron tratadas con vehículo. Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo y se dejaron adherir toda la noche. Posteriormente se hace la adición de los compuestos o fracciones por triplicado a las concentraciones deseadas en un volumen final de $125 \mu\text{L}$ y se incuba por 1 h bajo las mismas condiciones antes descritas. Pasado este tiempo se realiza la estimulación con LPS (concentración final $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ y volumen final $200 \mu\text{L}$) y se deja incubar por 22-24 h. Luego de la incubación, se transfiere una alícuota de $100 \mu\text{L}$ de sobrenadante a una placa nueva no estéril en donde se añade $50 \mu\text{L}$ del reactivo de Griess A (1 % sulfonilamida, 2 mol/L HCl) y se incuba a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se adiciona $50 \mu\text{L}$ del reactivo de Griess B (0.1 % N-1-naftoetilendiamina) y se mide la absorbancia en lector de microplacas (Dynex Technologies) a 540 nm con filtro de referencia a 630nm. Los ensayos de fracciones se hacen por duplicado en días distintos para asegurar una repetibilidad y los experimentos para calcular los IC_{50} se realizan por triplicado y en días distintos.

Para evaluar la viabilidad de las células y la citotoxicidad de las fracciones y compuestos se realiza un ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-H-tetrazolio) paralelo al de NO. Se adicionan $11 \mu\text{L}$ de MTT ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) a cada pozo luego de tomar la alícuota del ensayo anterior y se pone a incubar por 4 h a las condiciones antes descritas. Posteriormente se centrifuga a 1200 rpm por 10 min y se descarta el sobrenadante, el sólido precipitado de la sal de formazán se disuelve con $200 \mu\text{L}$ de HCl en IPA ($0.04 \text{ mol}/\text{L}$). Se transfieren $150 \mu\text{L}$ a una placa nueva y se mide en lector de placas

(Dyner Technologies) la absorbancia a 570 nm.

7.4.2. Evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo

Se realizó una evaluación de la viabilidad celular por medio de citometría de flujo y el uso de yoduro de propidio como marcador. Se cultivaron células de macrófagos de ratón RAW 264.7 en las mismas condiciones antes mencionadas. Se sembraron células en placas de 24 pozos a una densidad de 5×10^5 por pozo en un volumen de 400 μL y se dejaron adherir por la noche, posteriormente se añaden los compuestos **1** y **2** a las concentraciones deseadas por duplicado y se incuban por 1 h. Pasado este tiempo se añade LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen final de 500 μL y se incuban 22-24 h. Después de la incubación se transfiere el sobrenadante con las células no adheridas a un eppendorf y se hace un lavado de los pozos con PBS 10x. Se agregan 100 μL de tripsina-EDTA 1x a los pozos y se incuban por 10 minutos para separar las células del pocillo. Al completar la incubación se añaden 400 μL de PBS 10x para inactivar la tripsina y se trasvasan a un tubo eppendorf. Las muestras se centrifugan y se aspiran 900 μL de sobrenadante para volver al volumen inicial y se mezcla con el vórtex para homogenizar y medir en el equipo tiñendo con 5 μL de yoduro de propidio (1mg/mL). Se hacen dos repeticiones del experimento en días distintos.

7.4.3. Determinación de IC_{50} de los compuestos **1** y **2**

La concentración media inhibitoria de la producción de NO (IC_{50}) de los compuestos se determinó mediante un modelo de regresión lineal para el ámbito lineal de la curva de $\log_{10}[\text{concentración}]$ vs. actividad residual de los compuestos por duplicado a las diferentes concentraciones y con tres repeticiones en días distintos. Los valores de IC_{50} se calcularon realizando un modelo lineal construido a partir de los datos e interpolando para el 50 % del valor de actividad residual. El valor de IC_{50} para la citotoxicidad se calculó de la misma

manera que para la producción de NO. Los cálculos se realizaron mediante el programa R.

7.4.4. Ensayo inhibición directa de iNOS

Se sembraron 100 μL de células RAW 264.7 a 1×10^5 cel/mL en placas de 96 pozos que se incubaron durante la noche para dejar adherir las células. Se añadió LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de cultivo para alcanzar un volumen final de 200 μL en las condiciones excepto por el control negativo, al cual se añadió medio de cultivo sin LPS. Se incubaron las células por 24 h. Se tomaron 100 μL de sobrenadante para realizar la prueba de Griess y comprobar la estimulación de las células, posteriormente se aspira el medio restante y se repone con medio de cultivo en el que se disolvieron los compuestos en las diferentes condiciones por duplicado, en un volumen final de 200 μL y se deja incubar 22-24 h. Luego de la incubación se toman 100 μL para la determinación de NO por la reacción de Griess y se realiza prueba de citotoxicidad utilizando MTT. Se hace un control con L-canavanina, un inhibidor competitivo de iNOS, a concentraciones de 10 000, 2000, 1000, 500 y 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$. Se hacen dos repeticiones del experimento en días distintos.

7.4.5. Efecto de los compuestos sobre la expresión de genes por medio de PCR en tiempo real

Se sembraron 5×10^5 células RAW 264.7 por pozo en placas de 24 pozos, que se dejaron adherir por 24 h. Posteriormente se hace la adición del compuesto 1 a concentraciones de 10, 18 y 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ a un volumen final de 700 μL y se incuban por 1 h. Posteriormente se hace la estimulación con LPS de las células a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 1mL y se incuba durante cuatro horas. Pasado este tiempo se lleva a cabo la extracción

de ARN total.

La extracción de ARN total se hizo mediante el kit de extracción de QIAGEN RNeasy mini kit siguiendo el procedimiento brindado por el proveedor. La pureza y concentración del ARN obtenido se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop usando la relación de absorbancias 260/280nm. Se retrotranscribe 1 μ g de ARNm en un termociclador utilizando el kit RevertAidTM Minus First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific (Lot: 00068239) siguiendo el protocolo brindado por el fabricante. Después de obtener la hebra de ADNc, se realiza el proceso de amplificación para PCR por duplicado de cada condición en tiempo real de los siguientes genes: GAPDH, TNF- α , IL-10, CXCL2, CCL2, IL1- β , TGF- β (ver cuadro 4) utilizando el fluoróforo SYBR Green y el procedimiento brindado por el fabricante, el experimento se hace por duplicado en días distintos. El control de calidad de los resultados de PCR se realizó mediante curvas de disociación y la observación de un pico que evidencia la formación de un único producto con el programa de temperatura que se pueden observar en la figura 7.4. Las secuencias de los primers utilizados se puede ver en el cuadro 7.2.

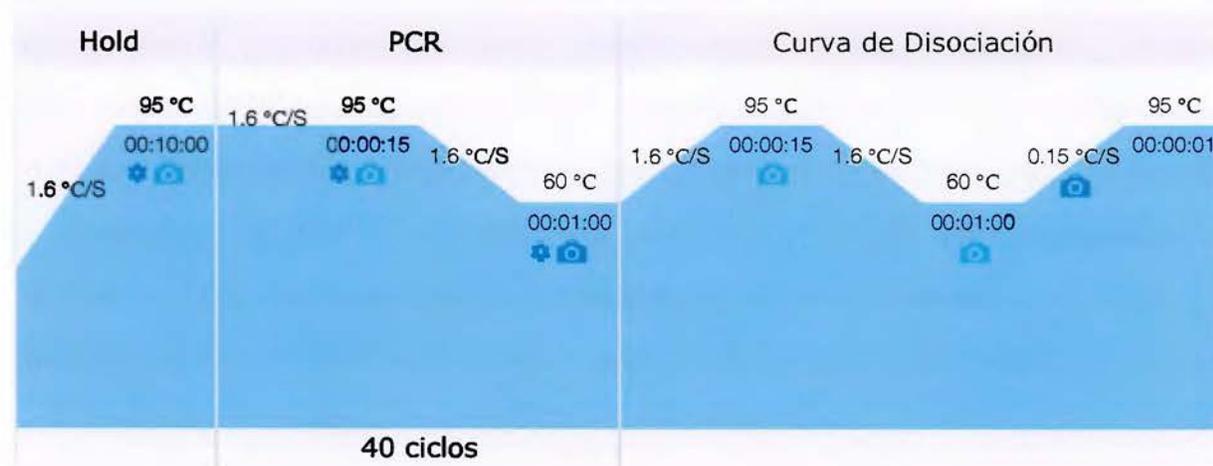


Figura 7.4: Programa de temperatura utilizado para las reacciones de PCR en tiempo real y la curva de disociación para el control de calidad del producto de la reacción.

Cuadro 7.2: Primers utilizados en qRT-PCR para el ensayo de expresión de genes.

Gen	Primer de 5' a 3'
GAPDH	F: TGACGTGCCGCTGGAGAAA
	R: AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG
TNF- α	F: CGGGCAGGTCTACTTTGGAG
	R: ACCCTGAGCCATAATCCCCT
CCL2	F: CACTCACCTGCTGCTACTCA
	R: GCTTGGTGACAAAACTACAGC
CXCL2	F: TGAACAAAGGCAAGGCTAACTG
	R: CAGGTACGATCCAGGCTTCC
IL-1 β	F: TGAACAAAGGCAAGGCTAACTG
	R: CAGGTACGATCCAGGCTTCC
IL-10	F: CCAAGCCTTATCGGAAATGA
	R: TTTTCACAGGGGAGAAATCG
TGF- β	F: CAACGACATCTATGAGAAAACC
	R: AAGCCCTGTATTCCGTCTCC

La expresión relativa de los genes se calculó mediante los ciclos de cuantificación (C_q) para el gen de interés y un gen de referencia (gen que se considera que se mantiene constante en diferentes células). El valor de C_q del gen de interés se normalizó con el C_q del gen de referencia GAPDH. A cada C_q de gen de interés amplificado de una muestra se le resta el C_q promedio del gen de referencia respectivo para obtener un ΔC_q . Posteriormente a las condiciones se les resta el ΔC_q promedio del control negativo correspondiente para obtener un $\Delta\Delta C_q$. Por último, el valor de $\Delta\Delta C_q$ se convirtió a expresión relativa mediante la conversión $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Se realizó un análisis de varianza de dos factores (experimento y condición) para observar diferencias significativas entre los valores de $\Delta\Delta C_q$ a un 95 % de confianza. En todos los casos se cumplen los supuestos de normalidad y homoscedasticidad. En el caso de detectar diferencias significativas en el análisis de varianza, se hizo uso de una comparación múltiple de medias como es la prueba de Dunnett para observar diferencias con respecto al control positivo a un 95 % de confianza. (ver Anexo II)

Resultados y discusión

8.1. Caracterización química de los compuestos 1 y

2

La separación guiada por el bioensayo de el extracto etanólico de la parte aérea de *P. garagaranum* C. DC. permitió el aislamiento de dos compuestos 1-2 ya reportados en la literatura. Los compuestos aislados fueron reportados para la especie *Piper saltuum*, en donde caracterizaron la estructura por medio de técnicas de resonancia magnética nuclear.⁵⁷ Las estructuras de los compuestos aislados en este trabajo fueron confirmadas por medio de una combinación de espectroscopía de RMN en una y dos dimensiones y espectrometría de masa de alta resolución.

El compuesto 1 se aisló como una sustancia aceitosa color amarillo pálido. El espectro de ¹³C-RMN muestra la presencia de 27 carbonos que coinciden con las estructuras reportadas anteriormente en la literatura. Su fórmula molecular se determinó como C₂₇H₃₈O₄, basado en el pico ión molecular positivo a un m/z 449.2646 ([M + Na]⁺, calculado para C₂₇H₃₈O₄Na m/z 449.2668) encontrado mediante HRESIMS (Ver Anexo).

El espectro de ¹H-RMN muestra dos señales aromáticas en posición *meta* a desplazamientos químicos de δ H 7.39 (d, $J = 1.96$ Hz) y 7.34 (d, $J = 2.02$ Hz) que acoplan entre si, este acoplamiento se confirma en el experimento de COSY. El espectro muestra un anillo aromático 1,3,4,5-tetrasustituido. Además, se puede ver la presencia de seis grupos metilenos alílicos entre δ H 2.12-1.96 por la integración obtenida de estas señales y el grupo alílico al anillo aromático que genera un desplazamiento a campo bajo de la señal a δ H 3.32 (d, $J = 7.27$ Hz). Se observan cuatro protones olefínicos en los desplazamientos entre

δ H 5.32 y 5.10 por la integración obtenida. El desplazamiento de las señales a campo bajo se debe a su proximidad al anillo aromático lo cual genera una desprotección de los núcleos. Las señales a δ H 5.32 y 5.14 presentan un acoplamiento complejo en donde se ve la presencia de un triplete de dobletes con una constante grande de ${}^3J_{8-7} = 7.27$ Hz y ${}^3J_{11-12} = 7.27$ Hz por los acoplamientos entre H-8/H-7 y H-12/H-11 y una constante pequeña de acoplamiento alílico ${}^4J_{8-26}$. La presencia de 5 grupos metilo se ven en los desplazamientos entre δ H 1.59 y 1.72 por las integraciones obtenidas.

La presencia de un carbonilo se observa en el espectro de ${}^{13}\text{C}$ -RMN con el carbono a un desplazamiento a δ C 168.19, lo cual confirma la presencia del ácido carboxílico. Por medio de los experimentos de COSY y HMBC se puede revelar que existe un sistema geranil-geranilo y es el sustituyente en la posición 3 del anillo aromático. Esta posición se hace evidente por los acoplamientos H-C entre el H-7 con los C-2, C-3, C-4, el H-2 con el C-7. Las asignaciones de las posiciones de los hidrógenos olefínicos se realiza viendo en el experimento HMBC los acoplamientos de ellos con los carbonos de los metilos, en donde se puede ver claramente los acoplamientos entre H-8/C-26, H-12/C-25, H-16/C-24 y H-20/C-23, C-22. Finalmente, el experimento de COSY hace posible confirmar los acoplamientos entre los hidrógenos olefínicos con los metilenos y los metilos. (ver figura 8.1)

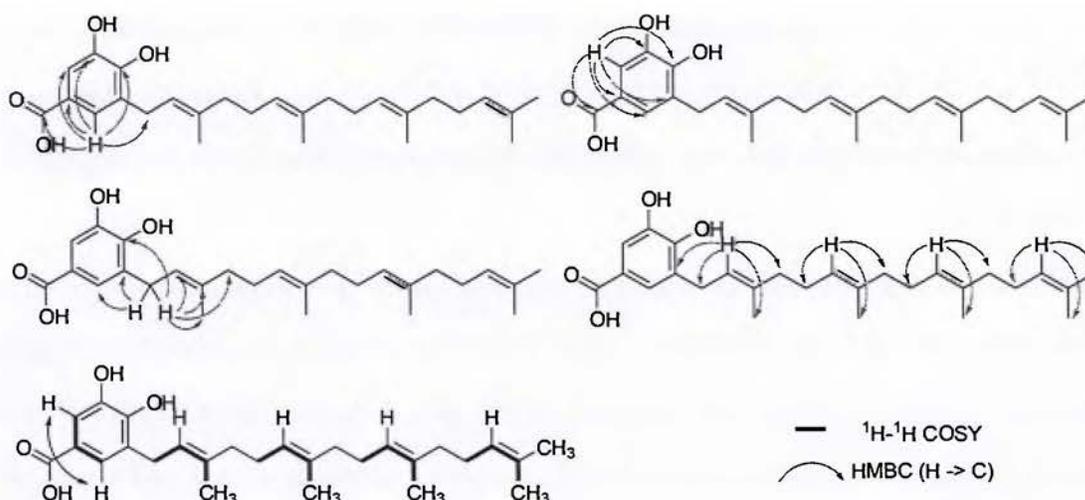


Figura 8.1: Correlaciones clave de HMBC (H→C, flechas rojas) y COSY (^1H - ^1H , flechas negras) para el compuesto **1**.

El compuesto **2** se aisló en menor cantidad como una sustancia aceitosa color amarillo oscuro. Al igual que el compuesto anterior, el espectro de ^{13}C -RMN muestra la presencia de 27 carbonos con desplazamientos distintos al del compuesto **1**. Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_3$ basado en el pico ion molecular positivo a un m/z 411.2918 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_3$ m/z 411.2899) encontrado mediante HRESIMS (Ver Anexo). La diferencia de 16 m/z entre las señales del ion molecular de ambos compuestos sugiere una estructura similar pero con la ausencia de un grupo hidroxilo en el anillo aromático para el compuesto **2**.

La ausencia de este grupo -OH se hace evidente en el espectro de ^1H -RMN debido a la diferencia en el patrón de sustitución observado. Se tiene un patrón 1,3,4-trisustituido al ver las señales de la región aromática, las señales a δH 7.77 (d, $J = 2.0$ Hz), 6.87 (d, $J = 8.3$ Hz) y 7.73 dd ($J = 8.3$ Hz y 2.0 Hz) muestran acoplamientos *orto* entre los protones H-5/H-6 que se refleja en la constante de 7.7 Hz y el acoplamiento *meta* entre H-2/H-6 que genera que la señal de H-6 sea un doblete de dobletes con una constante

grande *orto* y una constante pequeña *meta*. Tanto H-5 como H-2 son dobletes, pero con diferente constante de acoplamiento, una *orto* y una *meta* respectivamente. Este patrón de sustitución confirma que hay una diferencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo aromático.

Las demás señales del espectro son muy similares a las que se observan para el compuesto **1**, en los espectros de HMBC y COSY es posible observar el esqueleto del geranilgeranilo que es un sustituyente del anillo en la posición 3. Los acoplamientos del protón alílico en la posición 7 muestran que esa es la posición conectada con el anillo aromático al poder acoplar con los carbonos C-1, C-2, C-3 y C-4 del anillo, además de que el H-2 presenta el acoplamiento con el C-7. (ver figura 8.2)

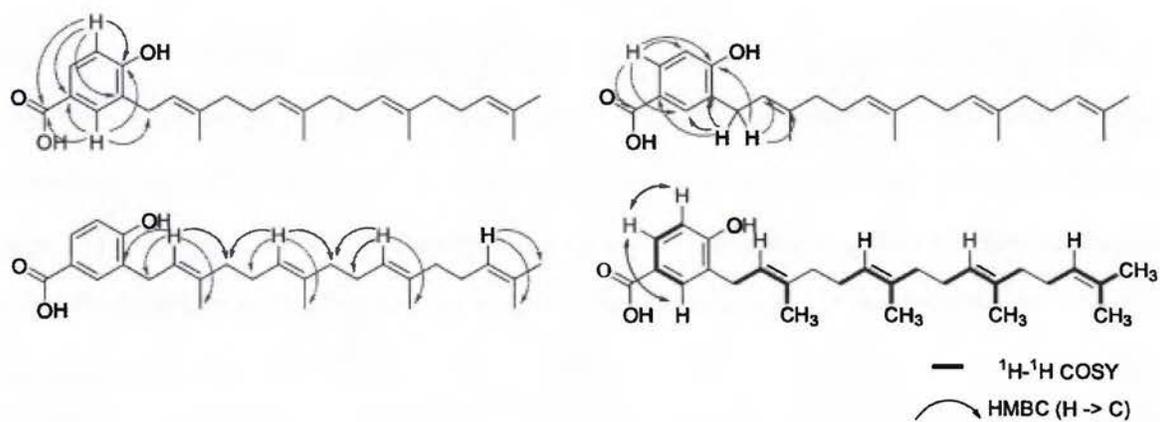
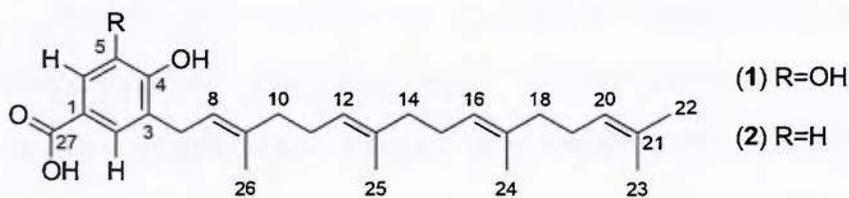


Figura 8.2: Correlaciones clave de HMBC (H→C, flechas rojas) y COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$, flechas negras) para el compuesto **2**.

Cuadro 8.1: Datos de ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150MHz) de los compuestos 1 y 2. (Medido en $\text{CH}_3\text{CN}-d_3$)

Posición	1		2	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	121.55	-	123.09
2	7.39 d (1.96)	124.08	7.77 d (2.0)	132.51
3	-	128.65	-	128.99
4	-	148.25	-	160.08
5	-	144.12	6.87 d (8.3)	115.64
6	7.34 d (2.02)	114.64	7.73 dd (8.2, 2.0)	130.38
7	3.34 d (7.27)	28.30	3.33 d (7.3)	28.80
8	5.32 d, t (7.35, 1.25)	122.52	5.33 t, d (7.0, 1.0)	123.00
9	-	137.13	-	137.50
10	2.12 m	40.10	2.06 m	40.50
11	2.05 m	26.92	2.04 m	27.31
12	5.14 d, t (6.97, 1.10)	124.78	5.14 t, d (7.0, 1.0)	125.36
13	-	135.43	-	135.99
14	1.96 m	40.02	1.96 m	40.48
15	2.11 m	26.94	2.12 m	27.36
16	5.10 m	124.88	5.10 m	125.18
17	-	135.60	-	135.81
18	1.96 m	40.09	1.97 m	40.42
19	2.05 m	27.16	2.06 m	27.54
20	5.10 m	124.98	5.10 m	125.28
21	-	131.75	-	132.14
22	1.67 d (1.08)	25.52	1.67 s	25.91
23	1.59 s	17.46	1.59 s	17.85
24	1.59 s	15.80	1.59 s	16.20
25	1.58 s	15.79	1.58 s	16.18
26	1.72 s	15.96	1.72 s	16.35
27	-	168.19	-	169.06



8.2. Actividad de los compuestos en los ensayos biológicos

COS

A los compuestos aislados se les realizó la determinación de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) para evaluar su potencial anti-inflamatorio al valorar su efecto sobre la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Al evaluar la inhibición de esta enzima por medio de la reacción de Griess, se está haciendo una observación sobre posibles propiedades anti-inflamatorias de los compuestos obtenidos. Una disminución de la producción de óxido nítrico en células que han sido tratadas con los compuestos y luego estimuladas con LPS para que se genere una producción exacerbada de NO, sugieren que estos compuestos podrían tener como efecto una disminución en esta respuesta inflamatoria.

Los valores obtenidos para cada compuesto se pueden observar en el cuadro 8.2. Se reporta en la literatura que la prenilación de compuestos es una adición química o enzimática de cadenas hidrofóbicas a una molécula aceptora (una molécula terpenoide, un compuesto aromático, proteínas, etc). En particular, la prenilación de metabolitos secundarios aromáticos juegan un papel muy importante en la biosíntesis de una gran espectro de moléculas que exhiben efectos farmacológicos valiosos. Muchos de esos ejemplos se pueden encontrar en diferentes clases de organismos como bacterias, animales y plantas.⁵⁸ Se ha visto que la adición de cadenas isoprenoides genera moléculas más efectivas que el compuesto de partida desde un punto de vista farmacológico. Por ello, la generación de nuevos productos naturales ‘híbridos’ representan una nueva frontera para el desarrollo de nuevos fármacos, en particular como agentes anti-oxidantes, anti-inflamatorios y anti-cancerígenos.⁵⁸

Se sabe que productos naturales prenilados, que llevan en su estructura básica grupos

prenilo, geranilo, farnesilo o geranilgeranilo como sustituyentes, pueden ser encontrados en especies de *Peperomia*, *Pothomorphe* y *Piper*. Estos compuestos prenilados están relacionados con actividades anti-microbianas, insecticidas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias, siendo los derivados de ácido benzoico prenilados de las especies de *Piper*, el grupo para los que se reporta la mayor actividad biológica.⁵⁹ Las actividades de este tipo de compuestos prenilados se puede deber a la lipoficidad que dan estos sustituyentes que confieren una mayor afinidad por membranas biológicas.⁶⁰

Los compuestos obtenidos de *Piper garagaranum* C. DC en este trabajo, son ácidos benzoicos prenilados que ya han sido reportados anteriormente para otras especies. Sin embargo, estos estudios previos no evaluaron sus propiedades anti-inflamatorias. Por eso un estudio de su actividad y posible mecanismo de acción es de importancia porque sería la primera vez que se reporta la actividad de estos compuestos. Los valores obtenidos (ver cuadro 8.2) muestran que efectivamente los compuestos **1** y **2** disminuyen la producción de óxido nítrico en células de macrófagos de ratón RAW 264.7 estimulados con LPS.

El compuesto **1** presenta un comportamiento en donde la viabilidad celular evaluada con MTT está asociada con la disminución de la producción de óxido nítrico, por lo que se puede decir que su propiedad anti-inflamatoria se debe en parte a que el compuesto ejerce un efecto tóxico que disminuye la viabilidad celular y la producción de NO. Sin embargo, la concentración a la que se observa una reducción en el 50% de la viabilidad celular es mayor que la concentración a la que se observa inhibición de iNOS. Por otro lado, en un experimento control se observó que al mezclar disoluciones de los compuestos con MTT, se da una reducción en ausencia de células (datos no mostrados), lo cual muestra que los compuestos reducen el MTT directamente. Este resultado sugiere que la estimación de viabilidad celular con este método sobreestima el número de células vivas. Es por esta razón que se realizó un experimento adicional para determinar la viabilidad celular con

citometría de flujo. (ver figura 8.3) La determinación de la viabilidad celular por este método no es afectada por el potencial reductor de los compuestos, y por lo tanto lleva a resultados más confiables.

Al evaluar la viabilidad del compuesto 1 mediante citometría de flujo se observa que entre 10 y 20 μM la viabilidad disminuye en un 50 %, es decir, se observa un mayor efecto citotóxico que el que se determinó utilizando MTT. Por otro lado, el comportamiento del compuesto 2 muestra que la curva de inhibición de iNOS se separa de la curva de citotoxicidad evaluada por MTT y se puede decir que el efecto de inhibición se atribuye en menor medida a la toxicidad del compuesto sobre las células. Al determinar viabilidad con citometría de flujo para el compuesto 2, se puede ver que la inhibición de iNOS si está relacionada con la citotoxicidad del compuesto 2 ya que a una concentración 20 μM la viabilidad disminuye en un 50 %. Al comparar la actividad citotóxica de ambos compuestos se puede ver que la presencia de un grupo hidroxilo afecta la actividad de los compuestos, siendo el compuesto 1 el más activo sobre las células. (ver figura 8.3)

Cuadro 8.2: Valores de IC_{50} obtenidos para los compuestos 1 y 2 aislados de *Piper garaganum* C. DC. en los ensayos de actividad biológica.

Ensayo	Compuesto 1	Compuesto 2
	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
Producción de NO	18 ± 3	26 ± 5
Viabilidad por MTT	28 ± 4	56 ± 5
Viabilidad por citometría de flujo	12	22

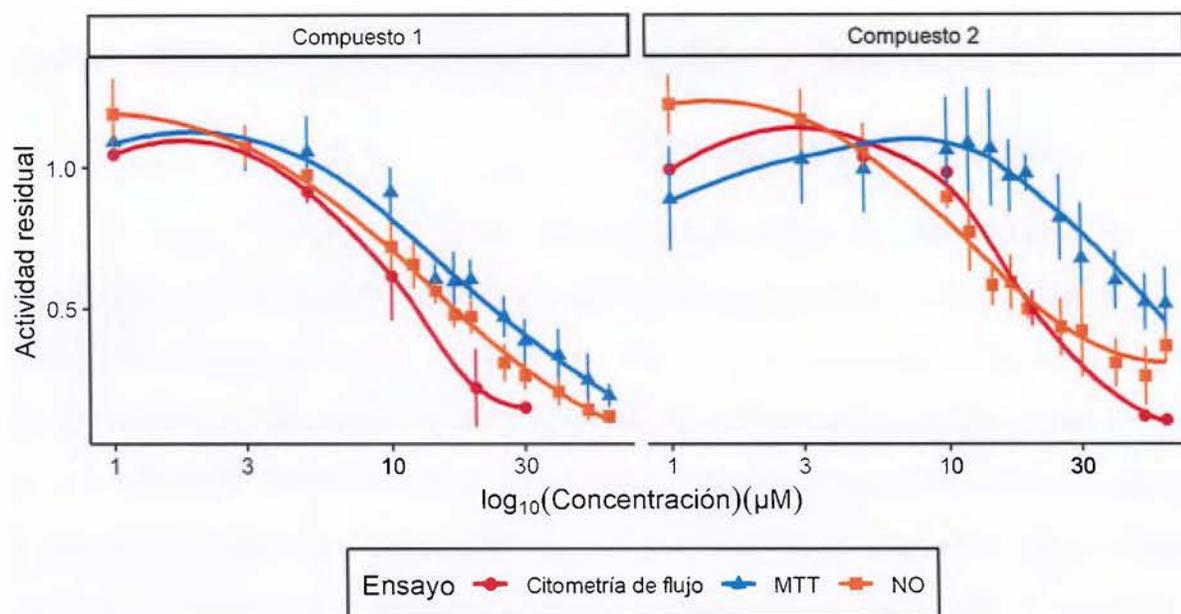


Figura 8.3: Determinación de los valores de IC_{50} para los compuestos **1** (izquierda) y **2** (derecha). Las curvas verdes corresponden a la inhibición en la producción de NO, las curvas azules la viabilidad celular evaluada por MTT y las curvas rojas a la evaluación de la viabilidad celular por medio de citometría de flujo y tinción con yoduro de propidio (círculos rojos). Cada punto para el ensayo de citometría de flujo es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar y cada punto para los ensayos de NO y MTT es el promedio de tres repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.

Al analizar el nivel de actividad de iNOS y de viabilidad celular en el proceso de separación a partir de los extractos crudos, se puede observar que la viabilidad fue disminuyendo con cada paso de purificación. Esto puede sugerir que existen otros componentes que ejercen un efecto citoprotector sobre las células y así se modula el efecto anti-inflamatorio observado y que por ello no se veía una toxicidad tan alta a etapas iniciales de la separación. Otra razón puede ser que el aumento de la toxicidad se deba a que con cada paso de separación la concentración de los compuestos aumenta y con ello su efecto sobre las células.

8.3. Estudio del posible mecanismo de acción sobre células RAW 264.7

Uno de los posibles mecanismos que podrían seguir los compuestos para disminuir la producción de óxido nítrico es mediante una inhibición directa de la enzima iNOS. Debido a que la sobreproducción de óxido nítrico puede causar desordenes neuronales, autoinmunes e inflamatorios, el diseño de inhibidores de las sintasas de óxido nítrico es un tema que ha llamado la atención para la prevención de enfermedades. La mayoría de los inhibidores de esta enzima son inhibidores competitivos, que poseen grupos guanidinio.⁶¹

Ejemplo de ello es la L-canavanina, que es un antagonista de la L-arginina en donde el grupo δ -metileno es remplazado por un oxígeno (ver figura 8.4), y es un inhibidor competitivo selectivo de la sintasa inducible de óxido nítrico.⁶¹ En el ensayo empleado primeramente se estimularon las células RAW 264.7 con LPS por 24 horas con el fin de provocar que se activen las rutas de señalización que son parte de la respuesta inflamatoria y se produzca la enzima iNOS (dentro de las células) y óxido nítrico. Luego se retiró el sobrenadante de las células y se repuso con los compuestos disueltos en medio fresco libre de óxido nítrico. Al hacer esto se puede ver si la enzima iNOS que ya está expresada dentro de las células es inhibida o no por los compuestos midiendo la producción de óxido nítrico con la reacción de Griess. De esta manera, se observó que la L-canavanina efectivamente inhibe la producción de óxido nítrico ($IC_{50} = 810 \pm 242 \mu M$) sin tener efectos citotóxicos sobre las células excepto a concentraciones muy altas de $10\ 000 \mu M$ (ver figura 8.6). Debido que el compuesto se añadió a las células luego de la estimulación con LPS, cualquier inhibición que se observe en este punto sólo se puede deber a una interacción directa con la enzima. Como la L-canavanina es un inhibidor competitivo de la enzima, se observa la inhibición esperada.

Para los compuestos **1** y **2**, se observa que a las concentraciones inhibitorias obtenidas anteriormente mediante el ensayo convencional, no hay una inhibición directa sobre iNOS, debido que no hay una disminución sobre la producción de óxido nítrico cuando las sustancias se añaden luego de haber estimulado con LPS, observando actividades residuales mayores al 90 % (ver figura 8.6). Estos resultados sugieren que los compuestos no ejercen su efecto inhibitorio a través de una interacción directa con la enzima.

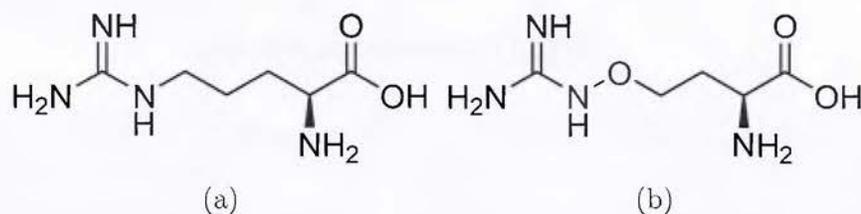


Figura 8.4: Estructuras moleculares de la (a) L-arginina y (b) L-canavanina

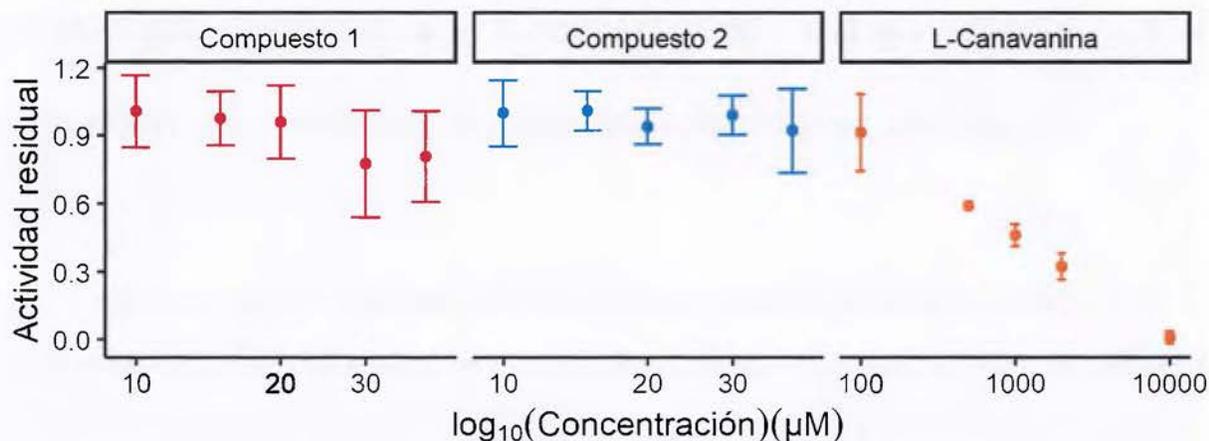


Figura 8.5: Inhibición en la producción de NO al añadir las sustancias luego de haber estimulado con LPS para los compuestos **1**, **2** y L-canavanina en células RAW 264.7. Cada punto es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.

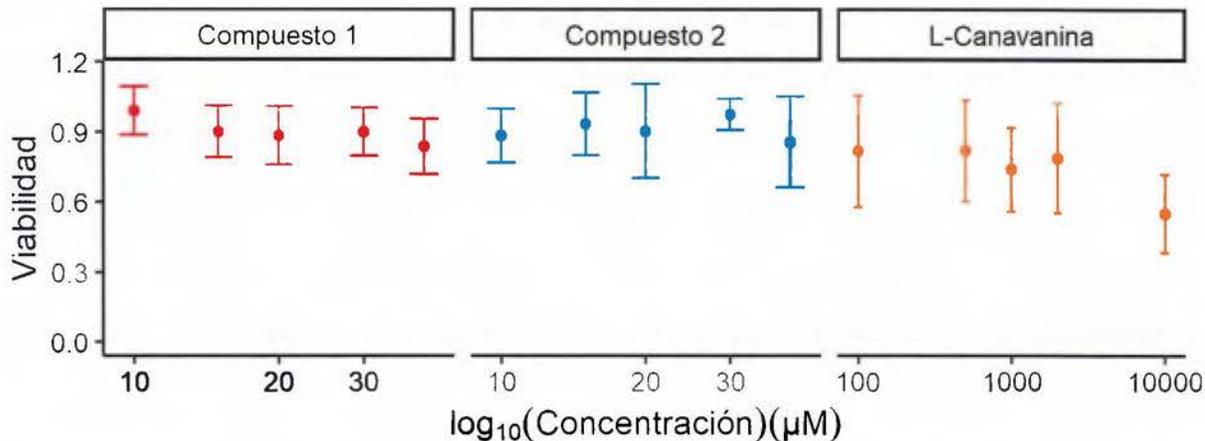


Figura 8.6: Efecto en la viabilidad celular al añadir las sustancias luego de haber estimulado con LPS para los compuestos **1**, **2** y L-canavanina en células RAW 264.7. Cada punto es el promedio de dos repeticiones y las barras de error corresponden a una desviación estándar.

8.4. Efecto de los compuestos 1 y 2 sobre la expresión de genes relacionados con el proceso de inflamación

Para evaluar el efecto del compuesto **1** sobre la expresión de ARNm de los genes pro-inflamatorios $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, los genes anti-inflamatorios $IL-10$ y $TGF-\beta$ y las quimiocinas pro-inflamatorias $CCL2$ y $CXCL2$ en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, se midieron los niveles de expresión relativos al gen de referencia GAPDH mediante PCR en tiempo real.

Como se puede observar en la figura 8.7, la expresión de $TNF-\alpha$ es la más baja en células de macrófagos sin estimular con LPS (CN, control negativo). Cuando hay una estimulación con LPS, hay una diferencia significativa en la expresión de ARNm de $TNF-\alpha$ en comparación con el control negativo ($p < 0.05$). Al agregar el compuesto **1** al medio antes

de la estimulación con LPS, la expresión de TNF- α disminuye de manera significativa a la concentración de IC₅₀ 18 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0.05$). Las concentraciones a 10 y 25 $\mu\text{mol/L}$ no muestran una inhibición significativa en comparación con el control positivo; a concentraciones menores (10 $\mu\text{mol/L}$) se empieza a ver una disminución de la expresión de TNF- α y a mayores (25 $\mu\text{mol/L}$) se ve que la expresión aumenta igual al control positivo, esto se puede deber a que en concentraciones altas la citotoxicidad que ejerce el compuesto puede estar desencadenando otros procesos que afecta la expresión del gen.

La reducción significativa de la expresión de este mediador en células tratadas con el compuesto **1** a 18 $\mu\text{mol/L}$ en comparación con las células tratadas solamente con LPS, indica que hay una inhibición en la transcripción de este mediador que resulta en una disminución de su producción y por lo tanto generando un posible efecto anti-inflamatorio.

Los efectos inhibitorios del compuesto **1** sobre IL-1 β se muestran en la figura 8.7. En las concentraciones de 10 a 18 $\mu\text{mol/L}$ se ve una disminución de la expresión de ARNm del gen IL-1 β conforme aumenta la concentración de manera significativa en comparación con el control estimulado ($p < 0.05$). A la concentración de 25 $\mu\text{mol/L}$ aún hay una inhibición significativa pero la disminución en la expresión es menor que para la concentración de 18 $\mu\text{mol/L}$. Esto puede ser debido al efecto de citotoxicidad que ejerce el compuesto sobre las células. La disminución de la expresión del gen indica que hay una actividad anti-inflamatoria al reducir la presencia de una citoquina que se conoce por aumentar y estimular los procesos de inflamación.

Como se puede observar en la figura 8.7, la expresión de IL-10 es significativamente mayor en las células estimuladas con LPS en comparación con el control negativo ($p < 0.05$). En la condición de 18 $\mu\text{mol/L}$ se observa una disminución significativa en la expresión del gen y se puede observar una tendencia similar con los genes estudiados anteriormente, lo cual es de esperar debido a que la mayoría de estos genes y su expresión

se rigen por los mismos factores de transcripción. Al no haber una estimulación de IL-10, se puede interpretar que el mecanismo de acción por el cual actúa el compuesto **1**, no es mediante la estimulación de esta citoquina anti-inflamatoria.

La figura 8.7 también muestra la expresión de TGF- β en las células RAW 264.7. Se puede observar que hay una diferencia significativa cuando hay una estimulación en la producción de este gen anti-inflamatorio en comparación con el control sin estímulo. Al ver el efecto del compuesto sobre la expresión del gen se puede observar que hay una disminución significativa con respecto al control positivo a las concentraciones de 10 y 18 $\mu\text{mol/L}$ que sugiere que el compuesto no tiene una influencia significativa sobre la producción de una citoquina que ayude a mitigar los efectos de la inflamación.

Al estimular las células con LPS se ve una diferencia significativa en la expresión del gen de la quimiocina CCL2 ($p < 0.05$) comparado con el control negativo. Las células tratadas con el compuesto **1** muestran una disminución significativa en la expresión de esta quimiocina, a 18 y 25 $\mu\text{mol/L}$ en comparación con el control positivo. Estos resultados coinciden con la disminución en los niveles de las otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , en donde al haber una inhibición de estos mediadores se provoca una disminución en los niveles de quimiocinas.

Por último, como se puede observar en la figura 8.7, la expresión de CXCL2 en células estimuladas con LPS es significativamente diferente al control sin estímulo ($p < 0.05$). Al ser tratadas con el compuesto **1** la expresión disminuye significativamente en las concentraciones de 10 y 18 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0.05$). Este comportamiento está relacionado con la disminución en la producción de las citoquinas IL-1 β y TNF- α que son mediadores que regulan la expresión de CXCL2. Al haber una disminución de las citoquinas pro-inflamatorias hay una consecuente disminución de los niveles de ARNm de CXCL2. A 25 $\mu\text{mol/L}$ se observa que no hay diferencias con respecto al control positivo y eso se puede

asociar al efecto citotóxico a concentraciones elevadas del compuesto sobre las células. Es importante recalcar que lo estudiado para el compuesto **1** también se puede aplicar para el **2** debido a su similitud estructural en donde se espera que el mecanismo de acción de ambos sea el mismo.

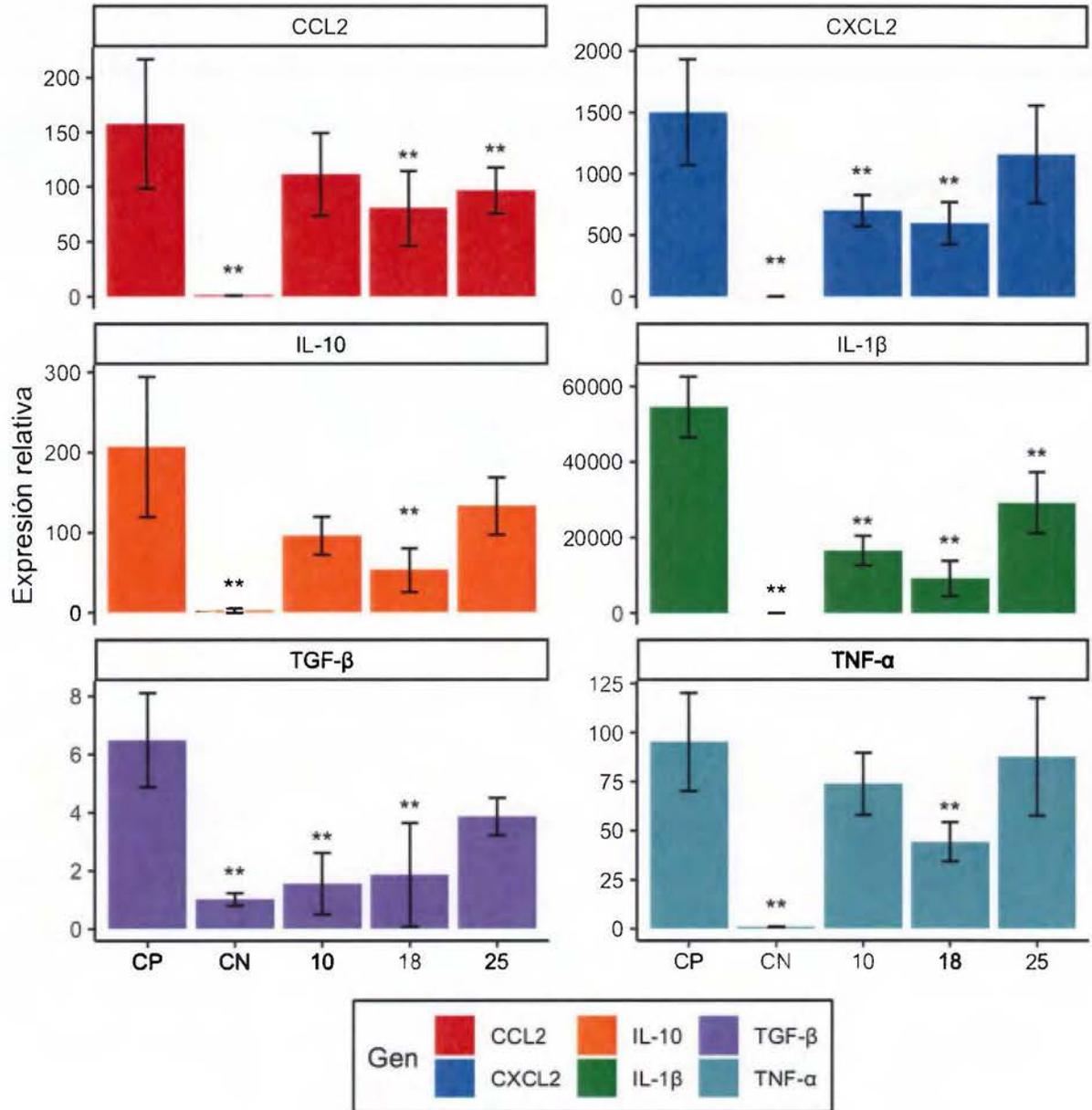


Figura 8.7: Efecto del compuesto 1 en los niveles de expresión de los genes CCL2, CXCL2, IL-10, IL-1 β , TGF- β y TNF- α en células RAW 264.7 activadas con LPS. Las células RAW 264.7 fueron pretratadas con el compuesto 1 a concentraciones de 10, 18 y 25 μ M por 24 h seguido por la activación con LPS a 1 μ g/mL por 4 h. El ARN se extrae, retrotranscrito y es usado para las reacciones de PCR en tiempo real utilizando el gen de referencia GAPDH para mostrar la expresión relativa. Los valores muestran el promedio y las barras de error corresponden a una desviación estándar. ** son significativamente distintos ($p < 0.05$) al control positivo (CP).

Los ácidos hidroxibenzoicos prenilados como los obtenidos de *Piper garagaranum* C. DC. no se han utilizado para estudiar actividad anti-inflamatoria, por lo que su mecanismo de acción sobre las células no ha sido reportado previamente. Compuestos con cadenas insaturadas como los tocotrienoles que son formas de la vitamina E (ver figura 8.8) tienen una estructura similar a las encontradas en los compuestos aislados por su cadena prenilada. Estos tocotrienoles se localizan en membranas celulares, la cola insaturada le da mayor actividad a este tipo de compuestos en comparación con los tocoferoles saturados. Se ha propuesto que la cola insaturada da mayor penetración a la bicapa lipídica de las membranas produciendo mayores efectos fisiológicos.⁶² Esta idea puede aplicarse al compuesto estudiado ya que la cola encontrada de geranil-geranilo confiere una mayor hidrofobicidad que pueda causar que el compuesto penetre efectivamente en la membrana celular o sea mas afín a ella.

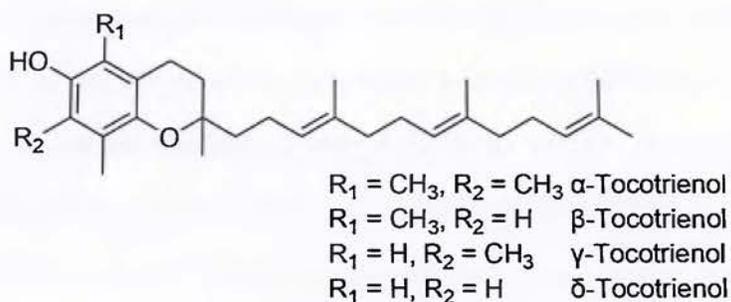


Figura 8.8: Estructura molecular de los diferentes tocotrienoles.

Este tipo de tocotrienoles tiene actividad anti-inflamatoria y se ha encontrado que disminuyen la activación del NF- κ B en distintas líneas celulares. Estos efectos se atribuyen al efecto inhibitorio sobre el proteasoma suprimiendo la actividad de IKK y la activación del factor de transcripción para generar citoquinas inflamatorias.^{63,64} Otros tipos de compuestos prenilados como por ejemplo la cumarina prenilada Osthole presentan el mismo tipo de inhibición sobre IKK para inhibir la fosforilación de I κ B α y la translocación de p65 y

p50 al núcleo en estudios sobre macrófagos activados con LPS.⁶⁵ Debido a esto, es posible que el compuesto tenga una actividad similar sobre las células RAW 264.7 y la inhibición de la actividad de iNOS y transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias se deba a que no hay una activación de NF- κ B para activar estos genes de la respuesta inmune. Sin embargo, para estar seguro de ello se debe hacer un estudio sobre la actividad de NF- κ B en presencia de estos compuestos y evaluar si hay una disminución en la translocación de p65 y p50 al núcleo que activa las respuestas inflamatorias. Un mecanismo de inhibición alternativo que se puede considerar consiste en estos compuestos, al ser muy afines a las membranas puede dificultar su interacción con las proteínas participantes en las rutas de señalización de NF- κ B que se encuentran dentro de las células y más bien podrían estar interfiriendo en lo que son los procesos de transducción de señales al afectar receptores en las membranas u otro tipo de proceso que se da en la superficie de las células.

Hasta el momento no existen estudios de citotoxicidad para este tipo de compuestos de ácidos benzoicos prenilados, pero se encuentra en la literatura la existencia de otras estructuras preniladas con efectos citotóxicos contra células cancerosas como lo son flavonoides prenilados. En estudios de acoplamiento molecular sobre la actividad citotóxica de flavonoides con y sin el grupo prenilo han mostrado que las estructuras preniladas tienen mayores energías de enlace a ciertas enzimas (relacionadas con células cancerosas) y suprimen su actividad como son las siguientes: aromatasas (CYP 19), sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés), xantina oxidasa (XO), ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), lipoxigenasa (LOX-3), ornitina descarboxilasa (ODC), tirosina quinasa (PTK), fosfoinositida 3-quinasa (P13K), quinasa C (PKC), topoisomerasa II, entre otras.⁶⁶

Otros estudios han mostrado que hay una influencia de grupos prenilo (isoprenilo, geranilo y farnesilo) sobre las actividades citotóxicas de compuestos comparados con las estructuras originales. Por ejemplo se ha estudiado que los compuestos 3-prenil-2,4,6-

trihidroxiacetofenona (3-PAP) y 3-geranil-2,4,6-trihidroxiacetofenona (3-GAP) (ver figura 8.9) muestran actividad citotóxica ante células cancerosas MCF-7 y HT1080 siendo más activo el derivado geranilo con valores de IC_{50} alrededor de $5 \mu M$ en comparación con valores alrededor de $20 \mu M$ del compuesto 3-PAP. El compuesto 3-GAP con su grupo geranilo modula la producción de las proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis Bax y Bcl-2 afectando la mitocondria en las células.⁶⁷

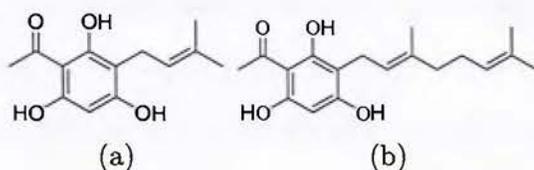


Figura 8.9: Estructuras moleculares de los compuestos (a) 3-PAP y (b) 3-GAP

En el estudio de nuevos isoflavonoides de *Onobrychis ebenoides* se encontró que una prenilación en la posición C-8 de estos compuestos resultaba en un comportamiento citotóxico sobre células de cáncer de mama.⁶⁸ También se muestra que la modificación con grupos prenilo en el flavonoide Baicaleina (ver figura 8.10) afecta la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax involucradas en el procesos de apoptosis en células THP-1 pero que su mecanismo aún no se conoce.⁶⁹ Estos resultados encontrados en la literatura sugieren que la prenilación es importante en los procesos de apoptosis y que posiblemente la cadena geranil-geranilo de los compuestos **1** y **2** puede estar asociada con la propiedad citotóxica que se observó en los resultados.

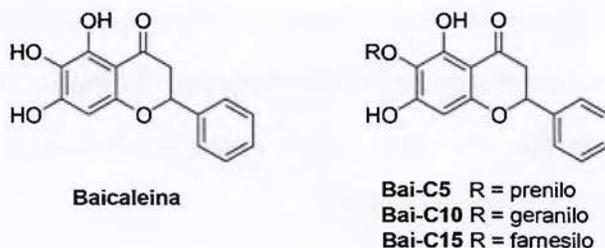


Figura 8.10: Estructuras del compuesto Baicaleina y sus derivados.

Conclusiones

Se determinó que *Piper garagaranum* C. DC. posee actividad anti-inflamatoria y citotóxica debido a la presencia de dos compuestos mayoritarios. Se aislaron en forma pura dos ácidos hidroxibenzoicos prenilados y se caracterizaron por medio de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Su actividad biológica fue evaluada en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, los compuestos **1** y **2** inhiben la producción de NO a un IC₅₀ de 18 ± 3 y 26 ± 5 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Los compuestos **1** y **2** tienen un efecto citotóxico que puede estar asociado con el efecto anti-inflamatorio al disminuir la viabilidad celular. Los compuestos no inhiben competitivamente la enzima iNOS en comparación con el control de L-canavanina, lo cual muestra que la inhibición de iNOS no se da por una interacción directa con los compuestos.

El compuesto **1** exhibe propiedades anti-inflamatorias al disminuir significativamente la transcripción de genes pro inflamatorios como TNF- α , IL-1 β y las quimiocinas CXCL2 y CCL2 a la concentración de IC₅₀, además no estimulan la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β para inhibir la función de mediadores pro-inflamatorios y debido a la similitud estructural con el compuesto **2** se puede esperar un mecanismo de acción similar.

Dentro de lo que podrían ser estudios futuros, se puede estudiar si hay una inhibición de NF- κ B para entender mejor si la disminución en los mediadores pro-inflamatorios iNOS y las citoquinas se debe a que no se da la translocación del factor al núcleo para que se de la transcripción y expresión de estos genes o cuál es el mecanismo que provoca la citotoxicidad de este compuesto en la células.

Bibliografía

- (1) Ortuño-Sahagún, D.; Zänker, K.; Rawat, A. K. S.; Kaveri, S. V. y Hegde, P. *Journal of Immunology Research* **2017**, *2017*, 1-2.
- (2) Jantan, I.; Ahmad, W. y Bukhari, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: An insight on their preclinical evaluation and clinical trials, 2015.
- (3) Delves, P. J. y Roitt, I. M. *New England Journal of Medicine* **2000**, *343*, ed. por Mackay, I. R. y Rosen, F. S., 37-49.
- (4) Kumar, D.; Arya, V.; Kaur, R.; Bhat, Z. A.; Gupta, V. K. y Kumar, V. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2012**, *45*, 165-184.
- (5) Ngo, Q. T.; Tran, P. T.; Tran, M. H.; Kim, J. A.; Rho, S. S.; Lim, C.-H.; Kim, J.-C.; Woo, M. H.; Choi, J. S.; Lee, J.-H. y Min, B. S. *Phytotherapy Research* **2017**, *31*, 663-670.
- (6) Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X. y Zhao, L. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204-7218.
- (7) Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D. y Sun, S.-C. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017**, *2*, 17023.
- (8) Taniguchi, K. y Karin, M. *Nature Reviews Immunology* **2018**, *18*, 309-324.
- (9) Pozdnyakov, N.; Lloyd, A.; Reddy, V. N. y Sitaramayya, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, *192*, 610-615.
- (10) Förstermann, U. y Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function, 2012.
- (11) Seo, W. G.; Pae, H. O.; Oh, G. S.; Chai, K. Y.; Kwon, T. O.; Yun, Y. G.; Kim, N. Y. y Chung, H. T. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *76*, 59-64.
- (12) Lancaster, J. y Stuehr, D. J. en *Nitric Oxide*; Elsevier: 1996, págs. 139-175.
- (13) Lirk, P.; Hoffmann, G. y Rieder, J. Inducible nitric oxide synthase—time for reappraisal. 2002.
- (14) Pautz, A.; Art, J.; Hahn, S.; Nowag, S.; Voss, C. y Kleinert, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase, 2010.
- (15) Zhang, J. M. y An, J. Cytokines, inflammation, and pain, 2007.
- (16) Dinarello, C. A. *Chest* **2000**, *118*, 503-508.
- (17) Pei, H.; Xue, L.; Tang, M.; Tang, H.; Kuang, S.; Wang, L.; Ma, X.; Cai, X.; Li, Y.; Zhao, M.; Peng, A.; Ye, H. y Chen, L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 2406-2417.

- (18) Nayak, B. N.; Kaur, G. y Buttar, H. S. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* **2015**, *13*, 1-7.
- (19) Pestka, S.; Krause, C. D.; Sarkar, D.; Walter, M. R.; Shi, Y. y Fisher, P. B. *Annual Review of Immunology* **2004**, *22*, 929-979.
- (20) Liu, J.; Zhang, H.; Liu, Y.; Wang, K.; Feng, Y.; Liu, M. y Xiao, X. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *362*, 575-581.
- (21) Opal, S. M. y DePalo, V. A. *Chest* **2000**, *117*, 1162-1172.
- (22) Laing, K. J. y Secombes, C. J. *Developmental and Comparative Immunology* **2004**, *28*, 443-460.
- (23) Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic, 1998.
- (24) Yoshie, O.; Imai, T. y Nomiya, H. en *Advances in Immunology*; Academic Press: 2001; vol. 78, págs. 57-110.
- (25) Matzer, S. P.; Baumann, T.; Lukacs, N. W.; Röllinghoff, M. y Beuscher, H. U. *The Journal of Immunology* **2001**, *167*, 4635-4643.
- (26) Bakuridze, A. D.; Kurtsikidze, M. S.; Pisarev, V. M.; Makharadze, R. V. y Berashvili, D. T. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **1994**, *27*, 589-595.
- (27) Wen, C. C.; Chen, H. M. y Yang, N. S., *Developing Phytocompounds from Medicinal Plants as Immunomodulators*, 1.^a ed.; Elsevier Ltd.: 2012; vol. 62, págs. 197-272.
- (28) Catanzaro, M.; Corsini, E.; Rosini, M.; Racchi, M. y Lanni, C. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2018**, *23*, DOI: 10.3390/molecules23112778.
- (29) Gagliullo, M.; Magnuson, B. y Kimball, L., *A Field Guide to Plants of Costa Rica*, 1.^a ed.; Oxford University Press: New York, 2007.
- (30) Tebbs, M. C. en *Flowering Plants · Dicotyledons*; Springer Berlin Heidelberg: 1993, págs. 516-520.
- (31) Callejas, R., *Manual de Plantas de Costa Rica: Volume VII*; Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., Zamora, N. y Troyo, S., eds.; Missouri Botanical Garden Press: 2014, pág. 848.
- (32) Gentry, A. H. y Dodson, C. H. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **1987**, *74*, 205.
- (33) Quijano-Abril, M. A.; Callejas-Posada, R. y Miranda-Esquivel, D. R. *Journal of Biogeography* **2006**, *33*, 1266-1278.
- (34) Oyemitan, I. A., *African medicinal spices of genus piper*; Elsevier Inc.: 2017, págs. 581-597.
- (35) Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. y Boll, P. M. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 597-673.

- (36) Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Cortez, D. A. G. y Nakamura, C. V. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *29*, 2126-2130.
- (37) Lin, L. C.; Shen, C. C.; Shen, Y. C. y Tsai, T. H. *Journal of Natural Products* **2006**, *69*, 842-844.
- (38) Yamaguchi, L. F.; Lago, J. H. G.; Tanizaki, T. M.; Mascio, P. D. y Kato, M. J. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1838-1843.
- (39) Salehi, B.; Zakaria, Z. A.; Gyawali, R.; Ibrahim, S. A.; Rajkovic, J.; Shinwari, Z. K.; Khan, T.; Sharifi-Rad, J.; Ozleyen, A.; Turkdonmez, E.; Valussi, M.; Tumer, T. B.; Monzote Fidalgo, L.; Martorell, M. y Setzer, W. N. *Molecules* **2019**, *24*, 1364.
- (40) Fazolin, M.; Estrela, J. L. V.; Catani, V.; Alécio, M. R. y de Lima, M. S. *Ciencia e Agrotecnologia* **2007**, *31*, 113-120.
- (41) Cáceres, A. y Kato, M. J. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* **2014**, *1*, 4-4.
- (42) Piper garagaranum C. DC. - Encyclopedia of Life.
- (43) Tsikas, D. *Journal of Chromatography B* **2007**, *851*, 51-70.
- (44) Stockert, J. C.; Blázquez-Castro, A.; Cañete, M.; Horobin, R. W. y Villanueva, Á. *Acta Histochemica* **2012**, *114*, 785-796.
- (45) Aguilera, P. y Tachiquín, M. R.
- (46) Moran, L. A.; Horton, R. A.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D. y col., *Principles of biochemistry*, 2014.
- (47) Kralik, P. y Ricchi, M. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 108.
- (48) Amsen, D.; de Visser, K. E. y Town, T. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2009**, *511*, 107-142.
- (49) Coussens, L. M. y Werb, Z. *Nature* **2002**, *420*, 860-867.
- (50) Pikarsky, E.; Porat, R. M.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Gutkovich-Pyest, E.; Urieli-Shoval, S.; Galun, E. y Ben-Neriah, Y. *Nature* **2004**, *431*, 461-466.
- (51) Kuper, H.; Adami, H. O. y Trichopoulos, D. *Journal of internal medicine* **2000**, *248*, 171-83.
- (52) Morera Salas, M.; Aparicio Llanos, A.; Xirinachs Salazar, Y. y Barber Pérez, P. *Gaceta Sanitaria* **2007**, *21*, 458-464.
- (53) Maroon, J. C.; Bost, J. W. y Maroon, A. *Surgical neurology international* **2010**, *1*, 80.
- (54) Shukla, S.; Bajpai, V. K. y Kim, M. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2014**, *13*, 17-33.

- (55) Mgbeahuruike, E. E.; Yrjönen, T.; Vuorela, H. y Holm, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species, 2017.
- (56) Chandra, P.; Pandey, R.; Srivastva, M.; Rameshkumar, K. B. y Kumar, B. *Industrial Crops and Products* **2015**, *76*, 967-976.
- (57) Maxwell, A. y Rampersad, D. *Journal of Natural Products* **1989**, *52*, 614-618.
- (58) Janakiram, N. B. y Rao, C. V. INOS-selective inhibitors for cancer prevention: Promise and progress, 2012.
- (59) López, S. N.; Lopes, A. A.; Batista, J. M.; Flausino, O.; Bolzani, V. d. S.; Kato, M. J. y Furlan, M. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 4251-4260.
- (60) He, B.-B.; Bu, X.-L.; Zhou, T.; Li, S.-M.; Xu, M.-J. y Xu, J. **2018**, DOI: 10.1021/ACSSYNBIO.8B00070.S001.
- (61) Babu, B. R.; Frey, C. y Griffith, O. W. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 25218-25226.
- (62) Suzuki, Y. J.; Tsuchiya, M.; Wassall, S. R.; Choo, Y. M.; Govil, G.; Kagan, V. E. y Packer, L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 10692-10699.
- (63) Nesaretnam, K. y Meganathan, P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, *1229*, 18-22.
- (64) Malavolta, M.; Pierpaoli, E.; Giacconi, R.; Basso, A.; Cardelli, M.; Piacenza, F. y Provinciali, M. Anti-inflammatory Activity of Tocotrienols in Age-related Pathologies: A SASPected Involvement of Cellular Senescence, 2018.
- (65) Brezani, V.; Smejkal, K.; Hosek, J. y Tomasova, V. *Current Medicinal Chemistry* **2018**, *25*, 1094-1159.
- (66) Chen, X.; Mukwaya, E.; Wong, M. S. y Zhang, Y. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids, 2014.
- (67) Cho, M.-Y.; Park, S.-Y.; Park, S.; Lee, Y. R.; Han, G.-d. y Kim, J.-A. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *35*, 98-104.
- (68) Halabalaki, M.; Alexi, X.; Aligiannis, N.; Lambrinidis, G.; Pratsinis, H.; Florentin, I.; Mitakou, S.; Mikros, E.; Skaltsounis, A. L. y Alexis, M. N. *Planta Medica* **2006**, *72*, 488-493.
- (69) Wu, J. Y.; Chung, K. T.; Liu, Y. W.; Lu, F. J.; Tsai, R. S.; Chen, C. H. y Chen, C. H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 2838-2845.

Anexo I

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = 1.0, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for I-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

178 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 200 best isotopic matches for each mass)

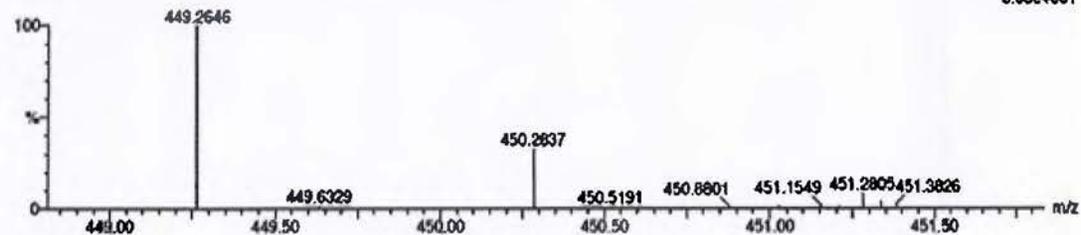
Elements Used:

C: 0-70 H: 0-150 O: 0-50 23Na: 0-1

G TAMAYO/SAENZ/ATESIS

Pg-DEP-36_37-1_POS 126 (4.917) AM (Top, 4, H1, 9200.0, 556.28, 1.00, LS 10); Sm (SG, 2x3.00); Sb (3, 40.00)

1: TOF MS ES+
8.03e+001



Minimum:				1.0				
Maximum:		5.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula	
449.2646	449.2668	-2.2	-4.9	8.5	23.9	0.0	C27 H38 O4 23Na	

Figura 10.1: Análisis de HRESIMS para el compuesto 1. (ESI+)

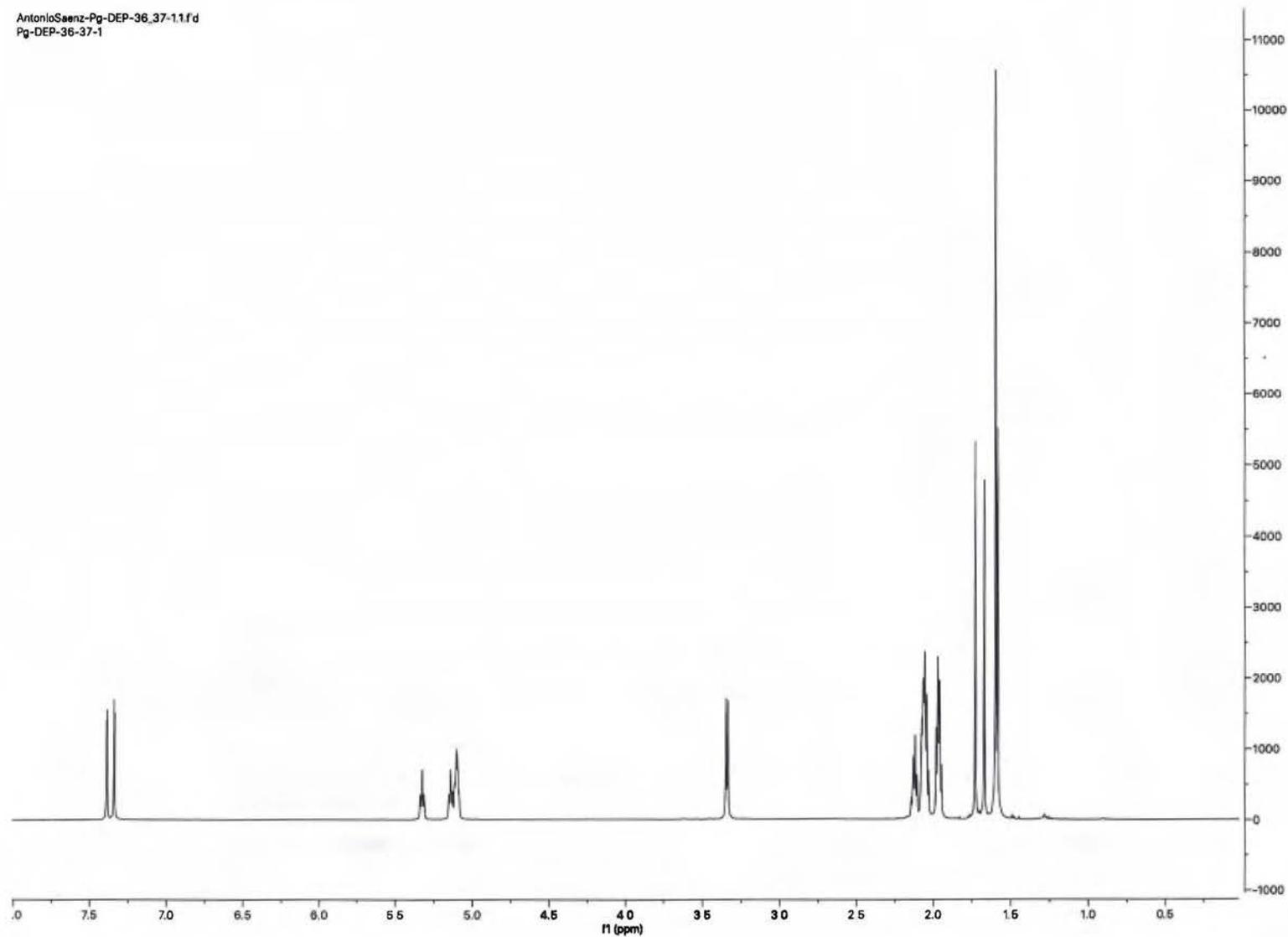


Figura 10.2: Espectro de ¹H-RMN (600MHz, CD₃CN) del compuesto 1.

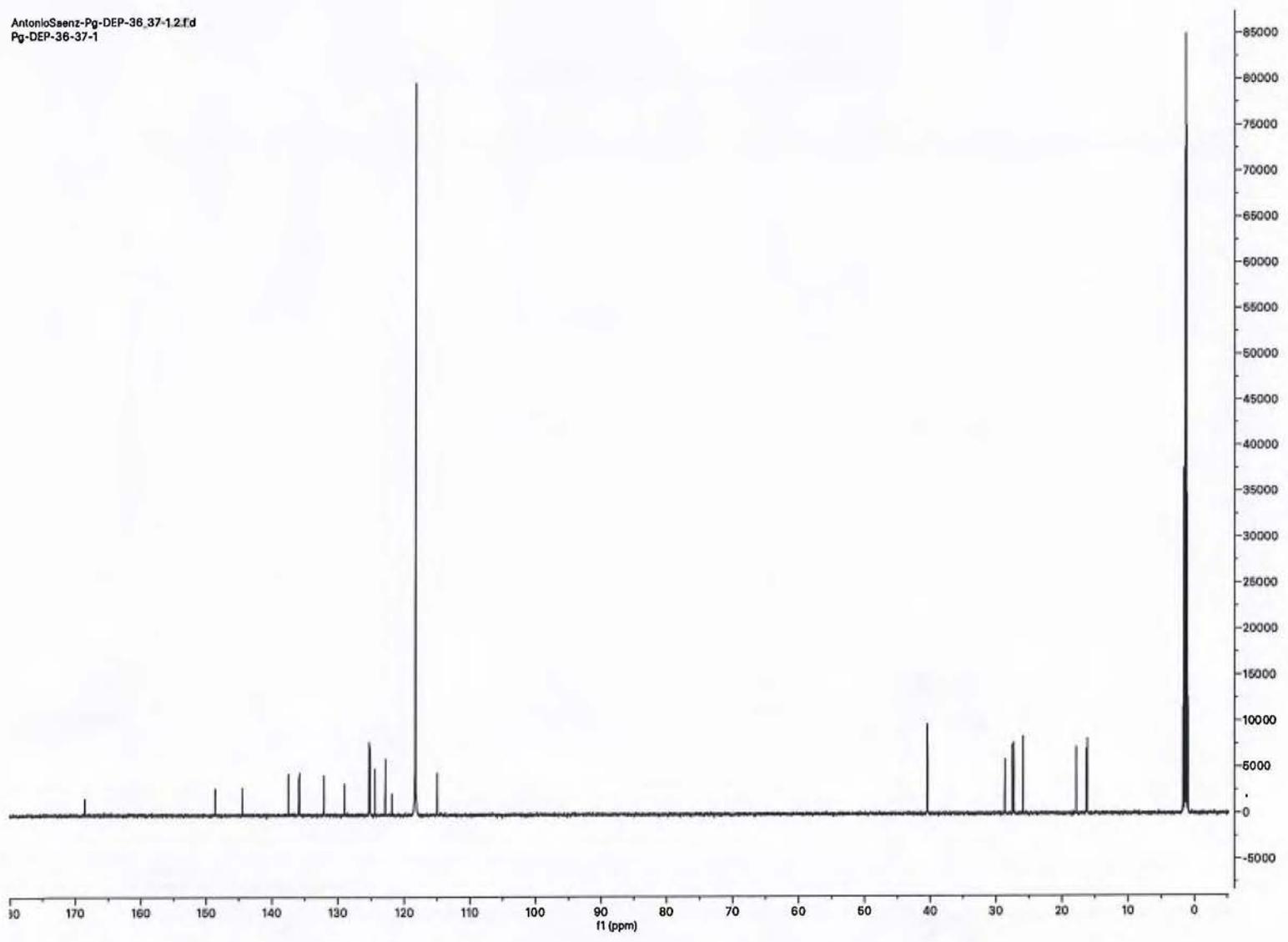


Figura 10.3: Espectro de ^{13}C -RMN (150MHz, CD_3CN) del compuesto 1.

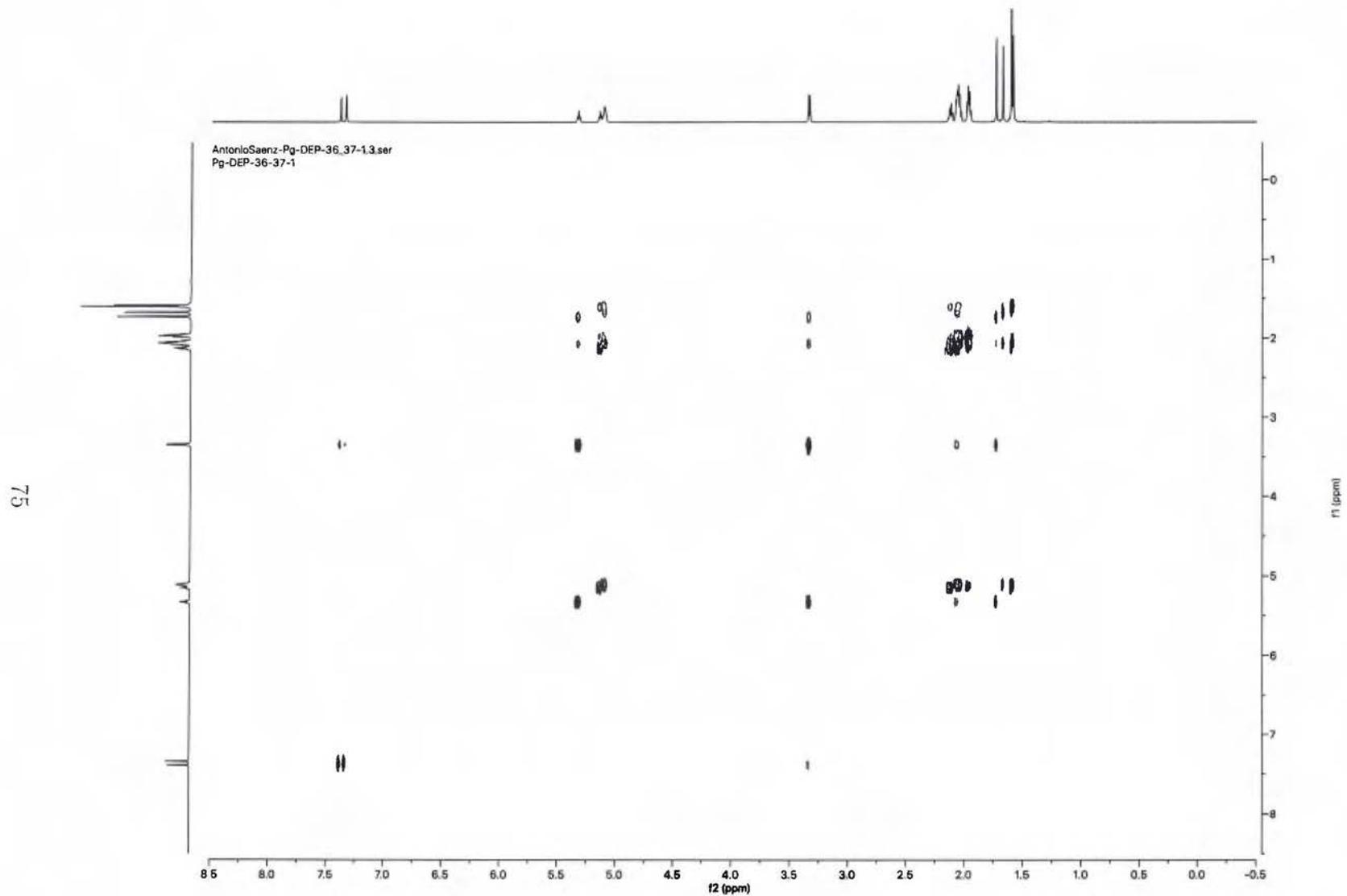


Figura 10.4: Espectro COSY del compuesto 1.

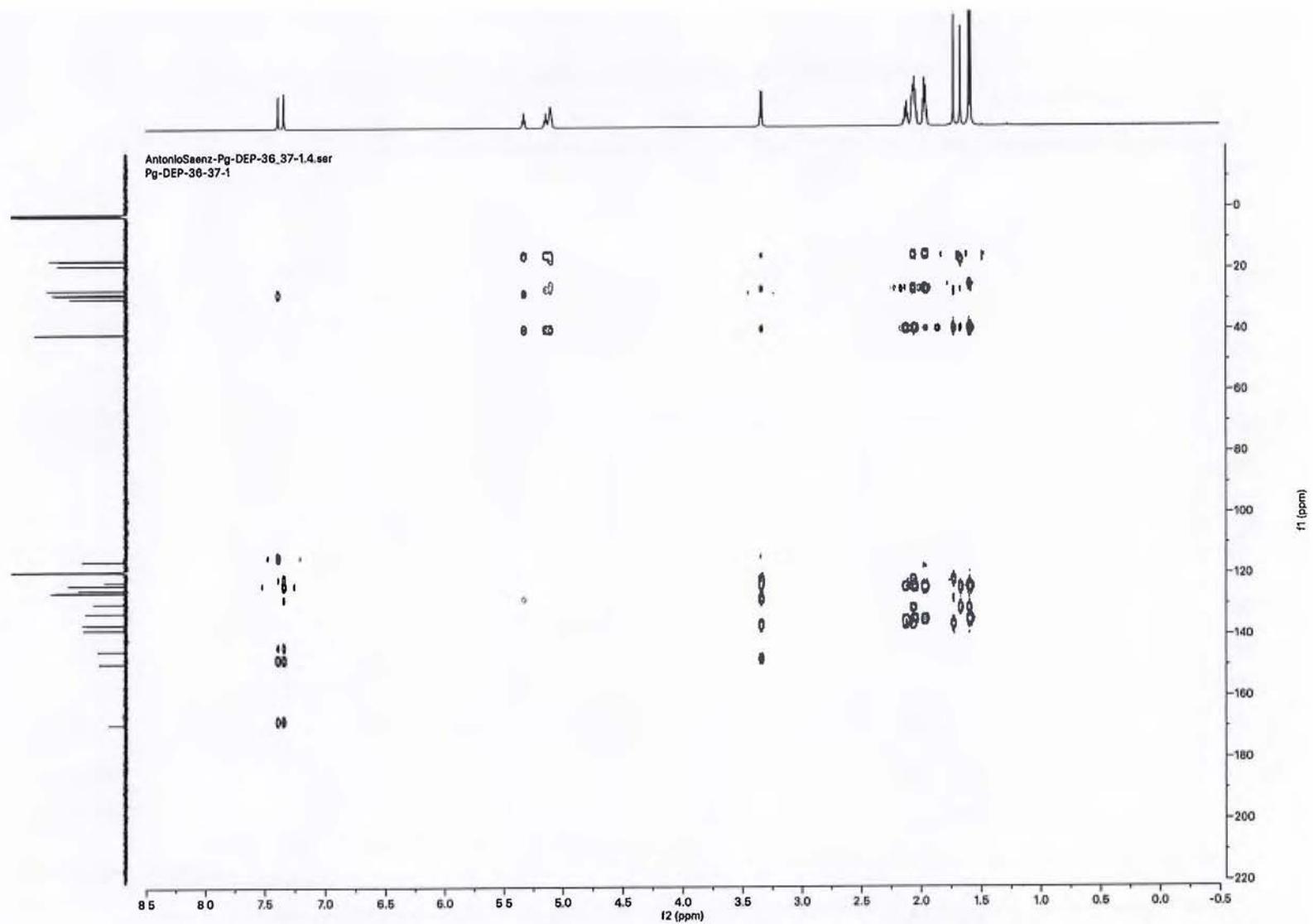


Figura 10.5: Espectro de HMBC del compuesto 1.

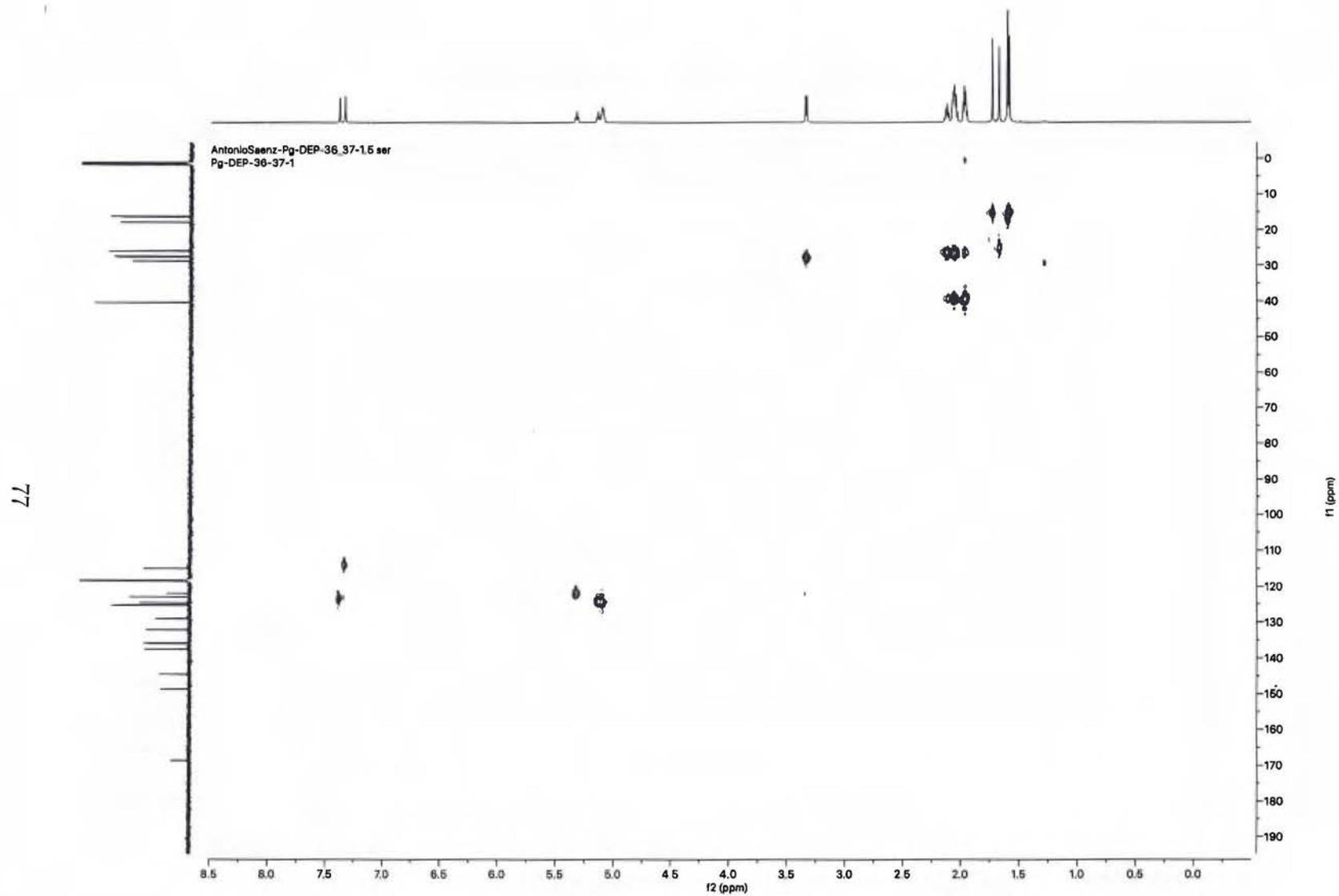


Figura 10.6: Espectro de HSQC del compuesto 1.

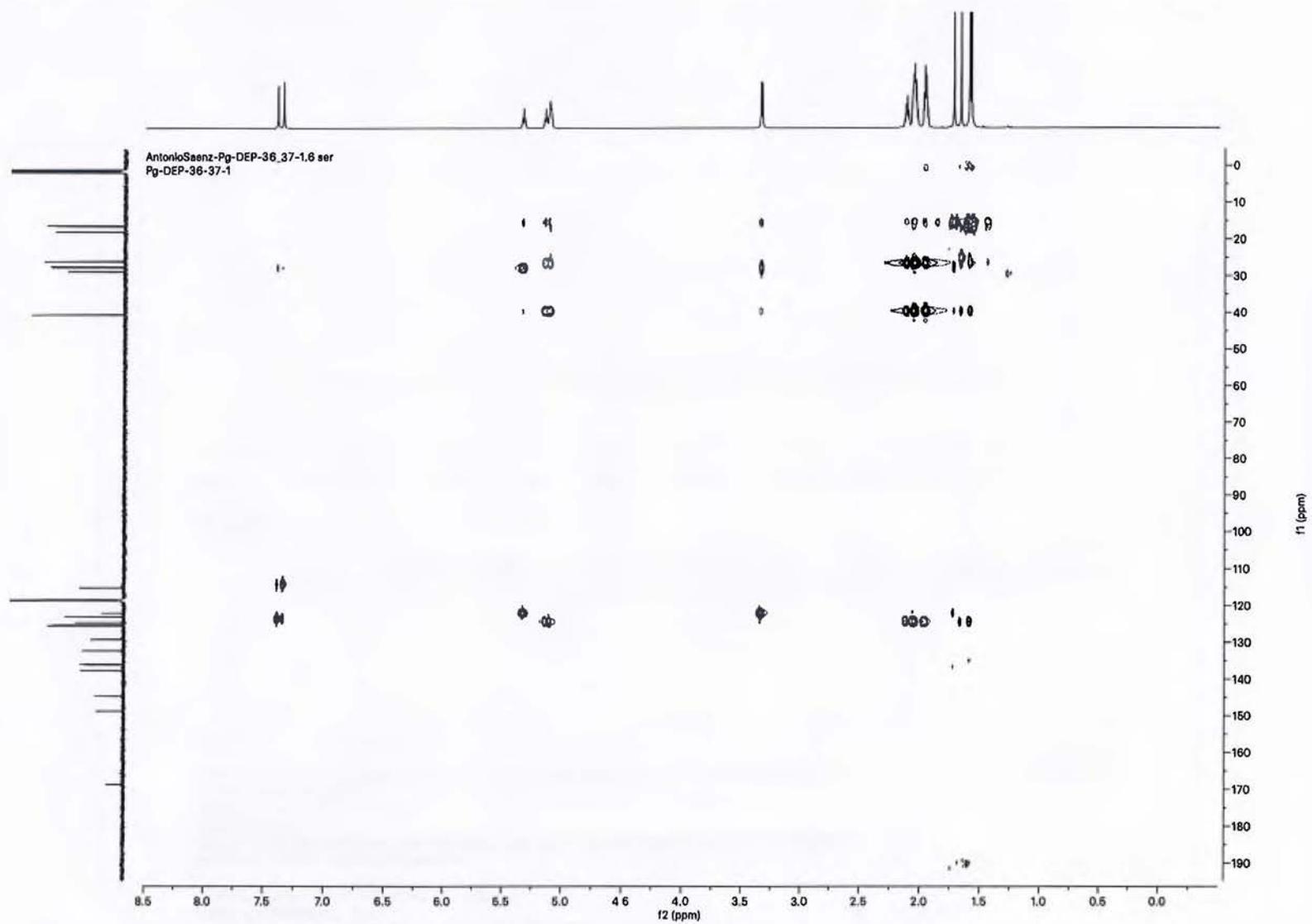


Figura 10.7: Espectro de HSQC-TOCSY del compuesto 1.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = 1.0, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

85 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 200 best isotopic matches for each mass)

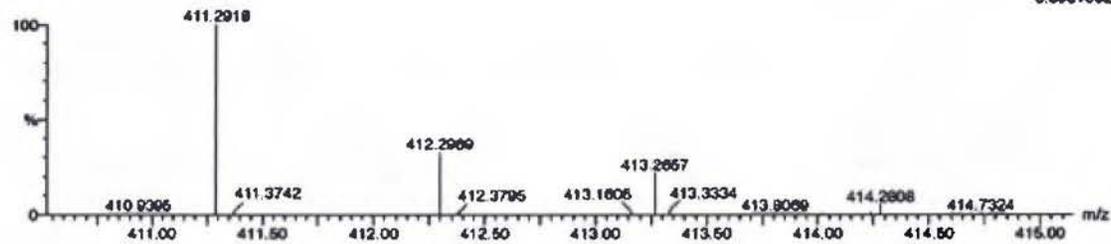
Elements Used:

C: 0-70 H: 0-150 O: 0-50

G TAMAYOSAENZA/TESIS

Pg-DEP-36_37-2_POS 127 (4.951) AM (Top:4, Ar:9200 0.556 28, 1.00, LS 10), Sm (SG, 2x3.00), Sb (3,40.00)

1: TOF MS ES+
6.39e+002



Minimum	Maximum	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
		411.2918	5.0	5.0	1.0	36.5	0.0	C27 H39 O3
		411.2999	1.9	4.6	8.5			

Figura 10.8: Análisis de HRESIMS para el compuesto 2. (ESI+)

AntonioSeenz-Pg-DEP-36_37-2.1.fid
Pg-DEP-36-37-2

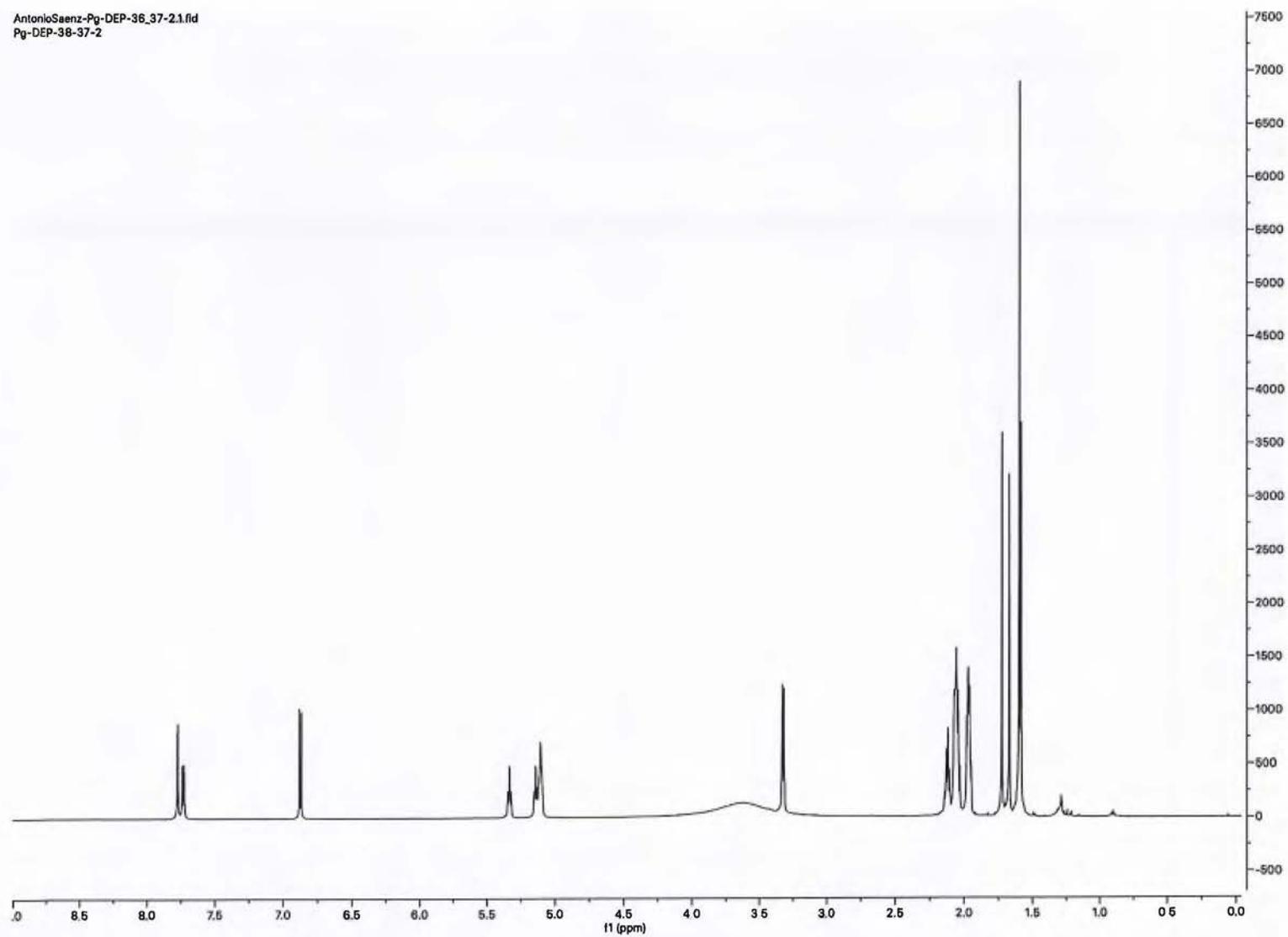


Figura 10.9: Espectro de ^1H -RMN (600MHz, CD_3CN) del compuesto 2.

AntonioSaenz-Pg-DEP-36_37-2.2.fid
Pg-DEP-36-37-2

81

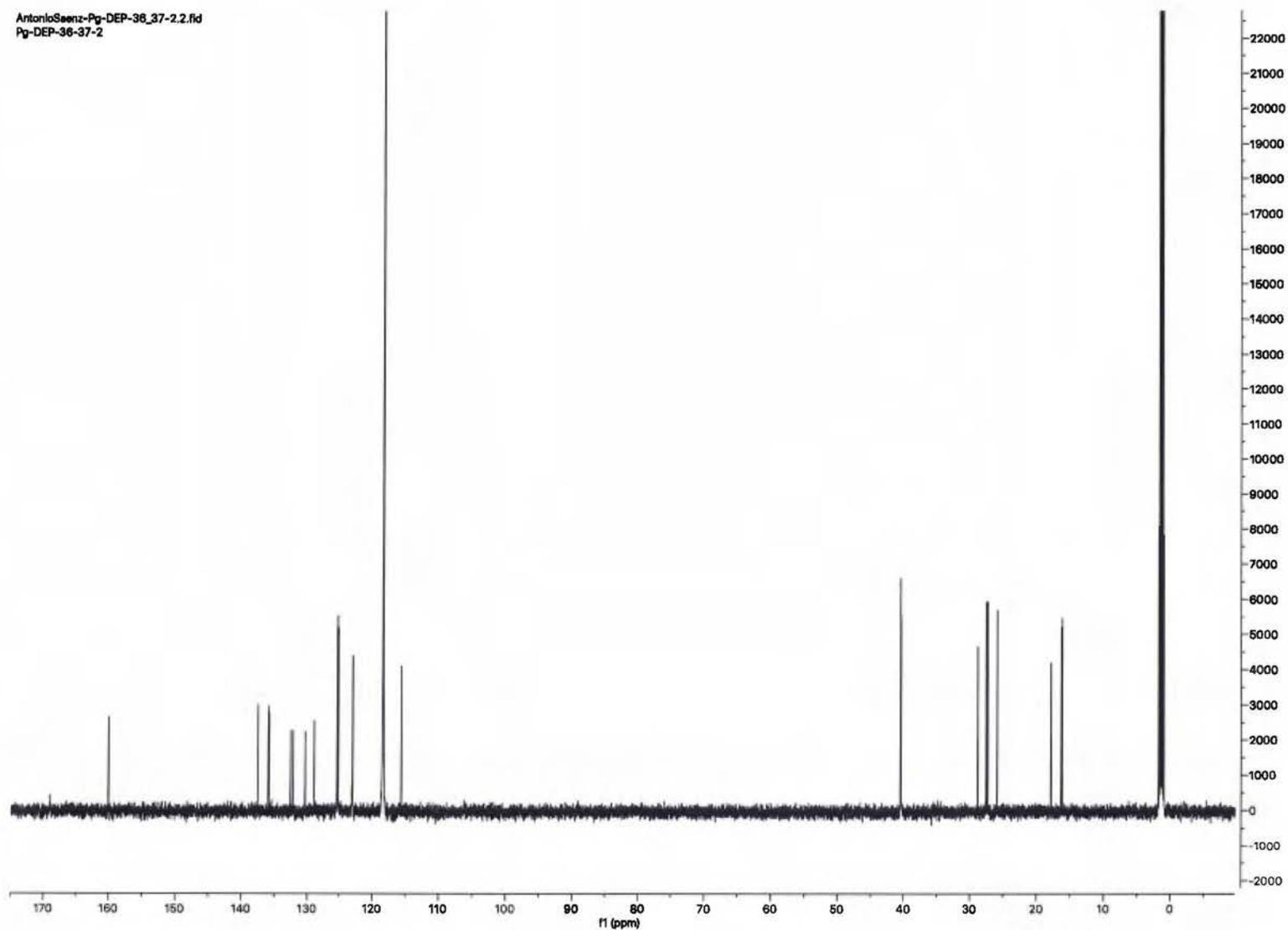


Figura 10.10: Espectro de ^{13}C -RMN (150MHz, CD_3CN) del compuesto **2**.

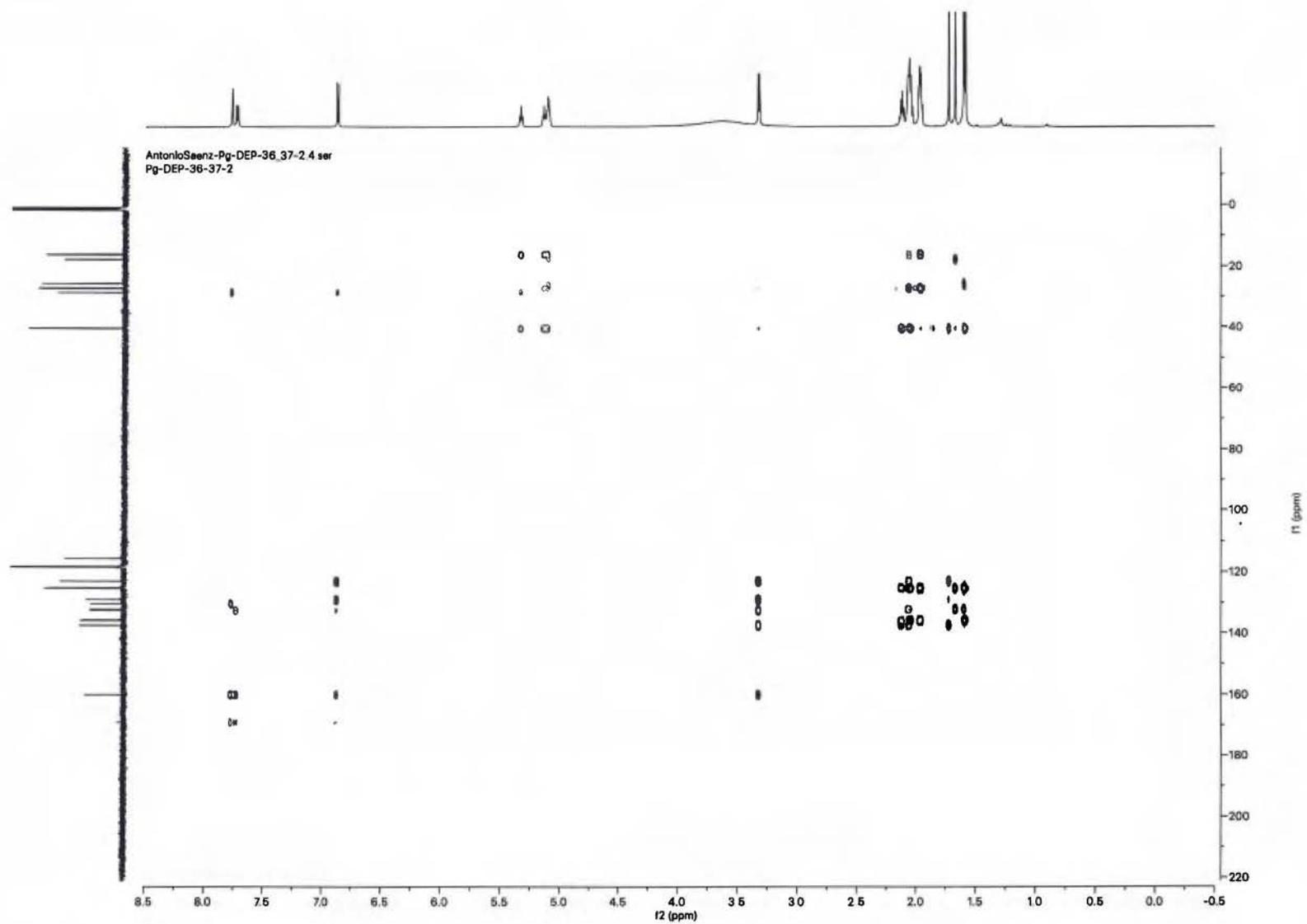


Figura 10.12: Espectro de HMBC del compuesto 2.

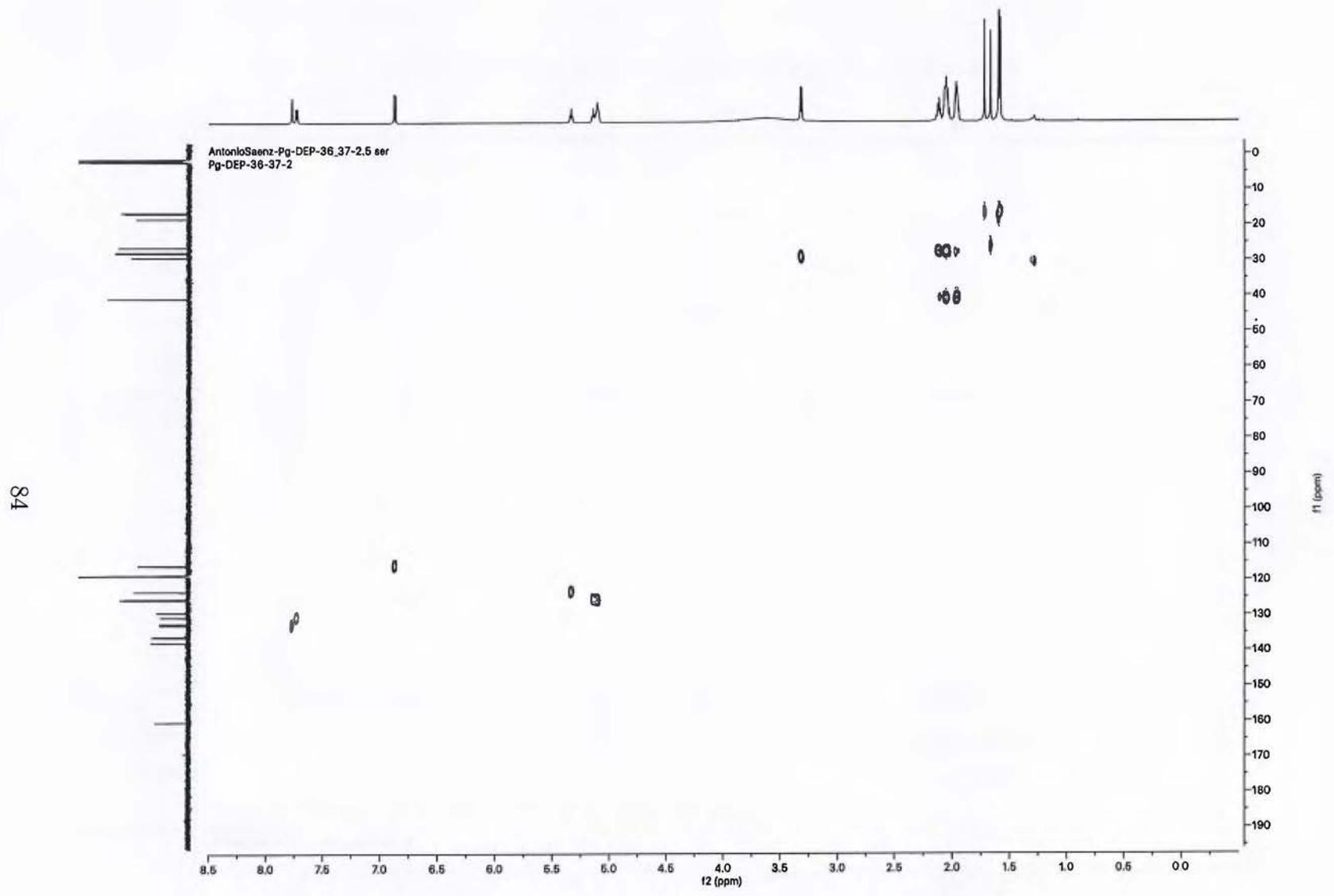


Figura 10.13: Espectro de HSQC del compuesto 2.

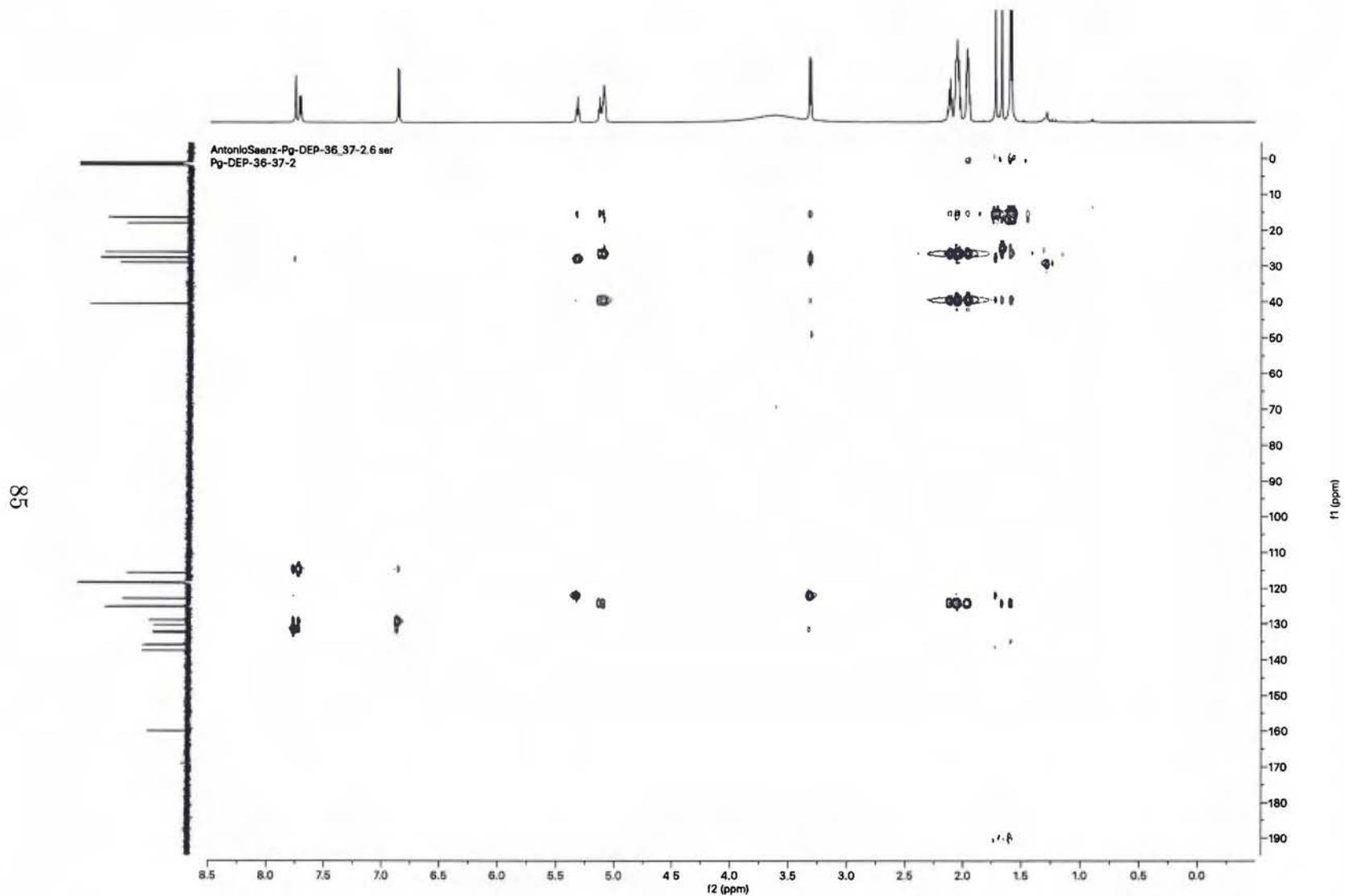


Figura 10.14: Espectro de HSQC-TOCSY del compuesto 2.

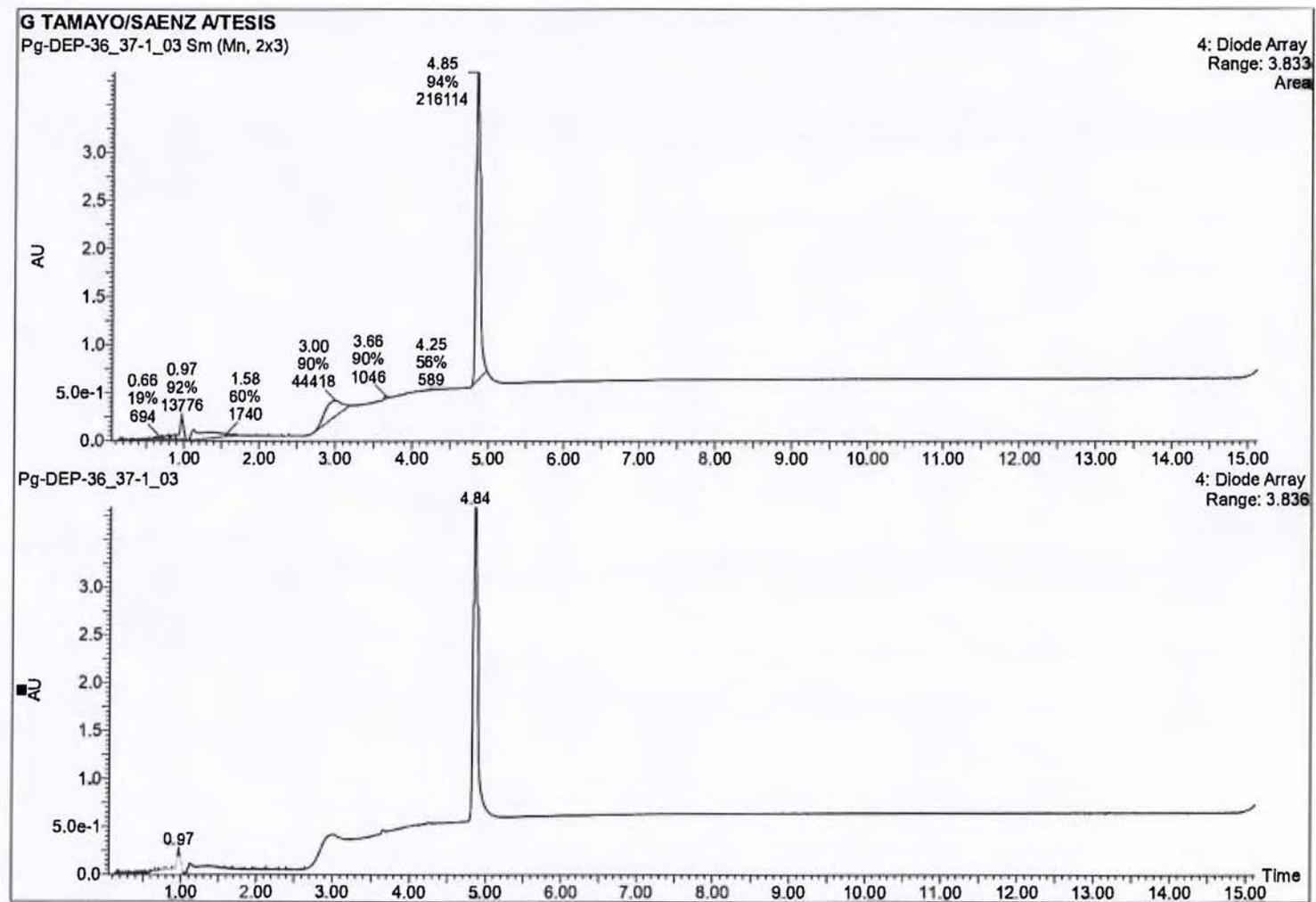


Figura 10.15: Determinación de pureza por UHPLC del compuesto 1.

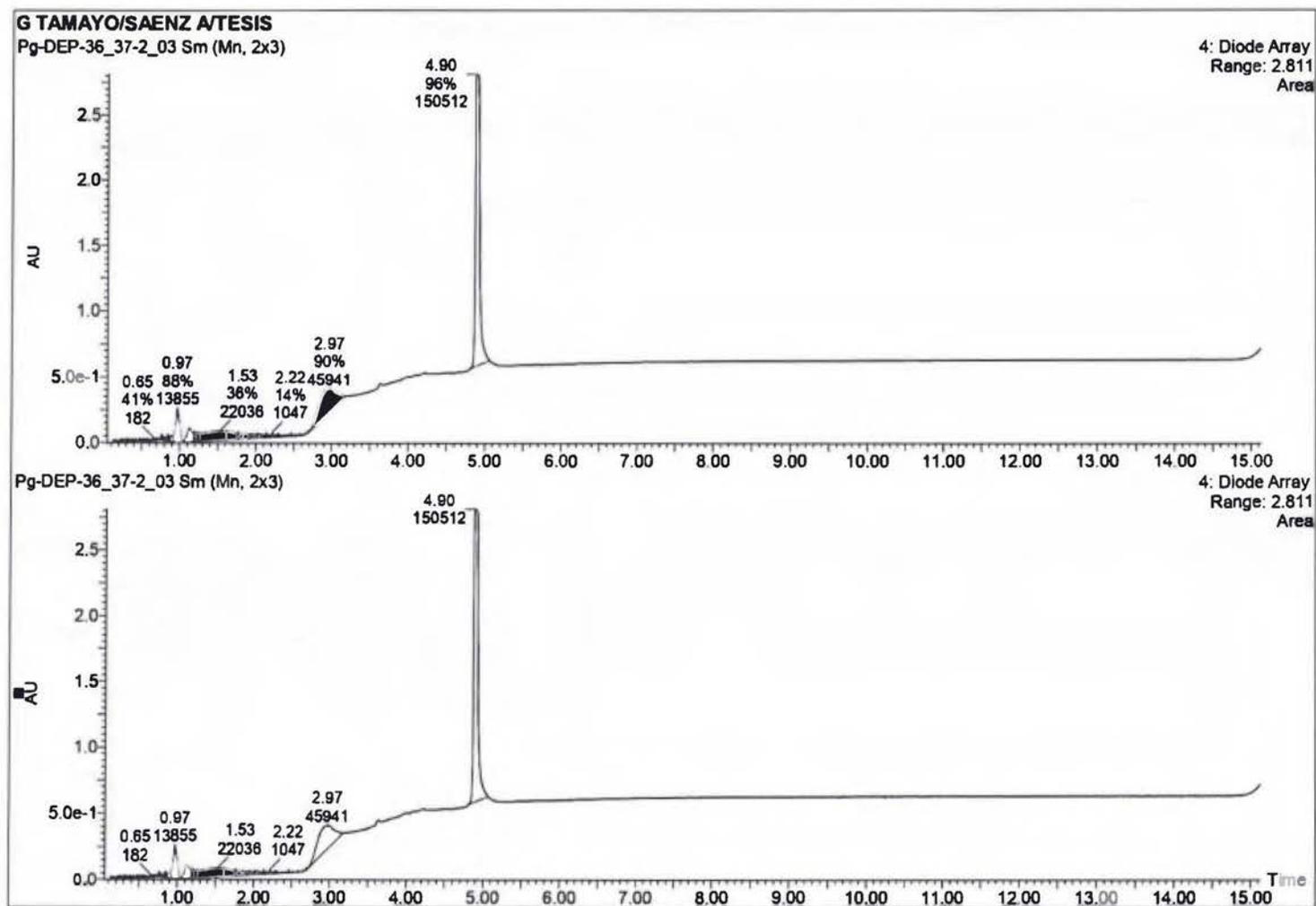


Figura 10.16: Determinación de pureza por UHPLC del compuesto 2.

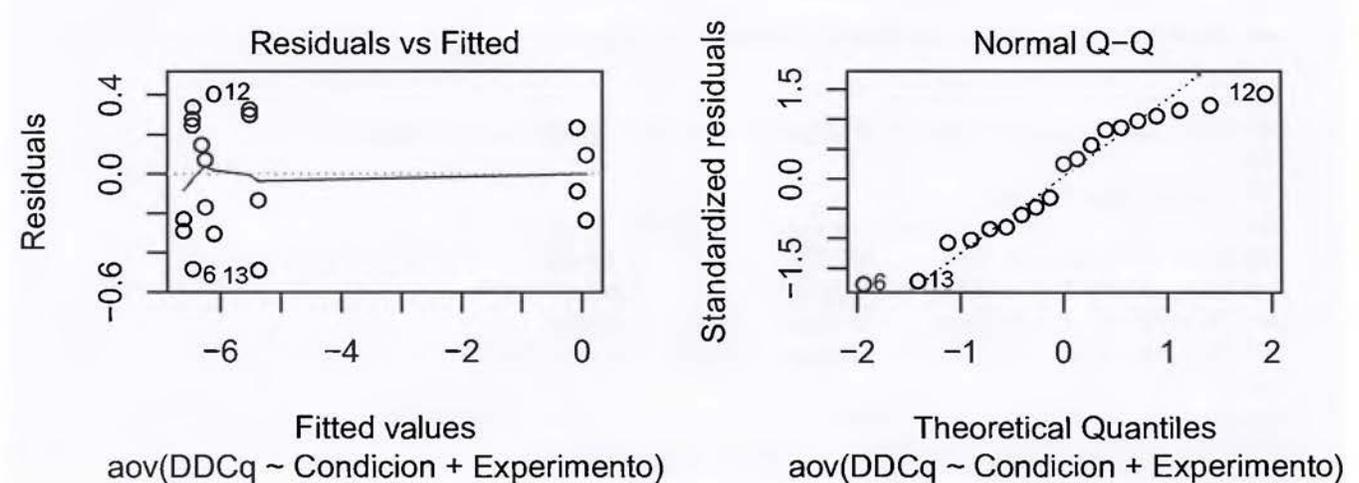
Anexo II

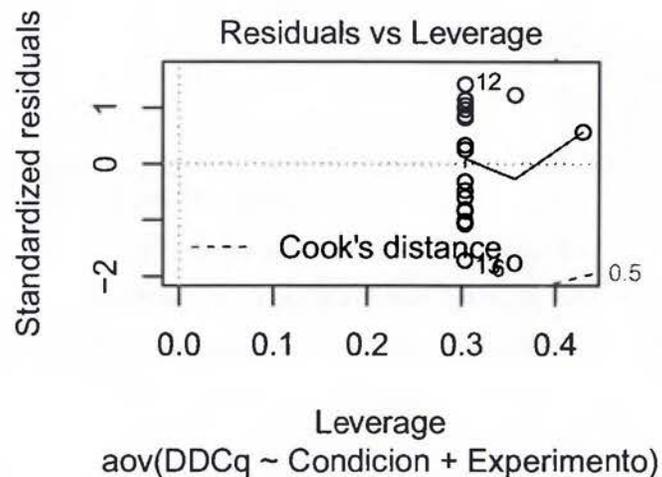
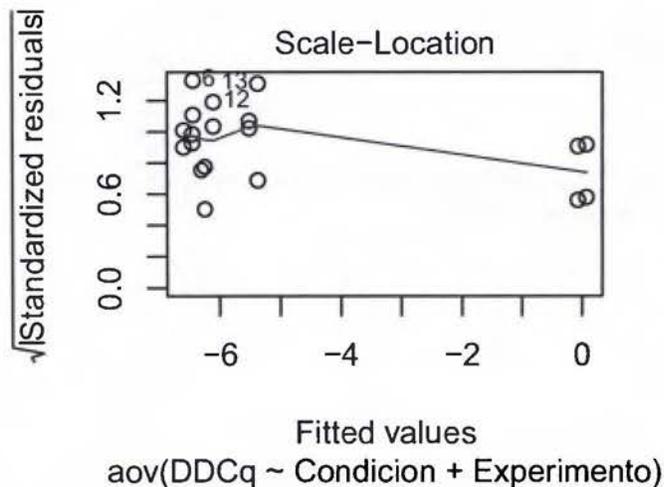
A continuación se muestran la evaluación de supuestos y las pruebas de significancia estadística para los experimentos de expresión por qRT-PCR realizado en el programa R.

```
## Loading required package: mvtnorm
## Loading required package: survival
## Loading required package: TH.data
## Loading required package: MASS
##
## Attaching package: 'TH.data'
## The following object is masked from 'package:MASS':
##
##   geyser
```

1. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen TNF- α

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Condicion   4 121.160  30.2899  259.5961 2.948e-12 ***
## Experimento  1   0.097   0.0970   0.8311   0.3785
## Residuals  13   1.517   0.1167
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: TNFa.aov$res
## D = 0.1582, p-value = 0.6714
## alternative hypothesis: two-sided
```

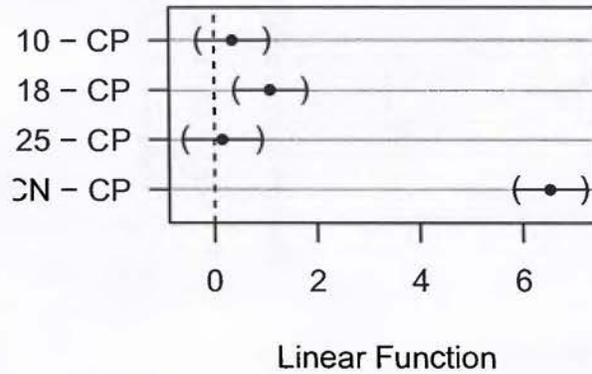
Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: TNFa$DDCq by TNFa$Condicion
## Bartlett's K-squared = 1.7648, df = 4, p-value = 0.7789
```

Prueba de Dunnet para la comparación de medias

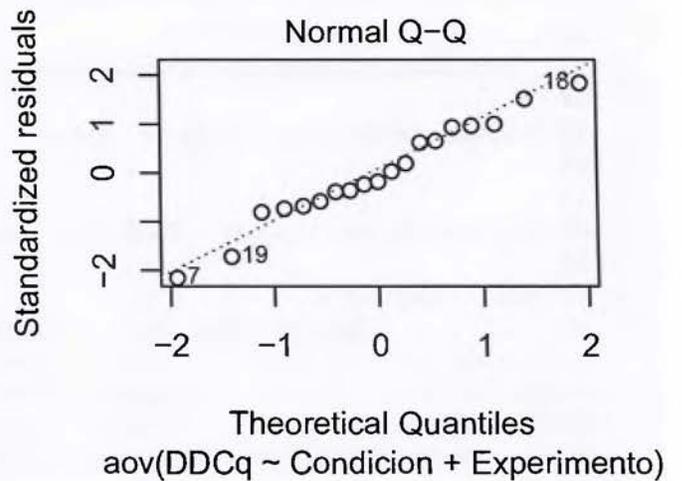
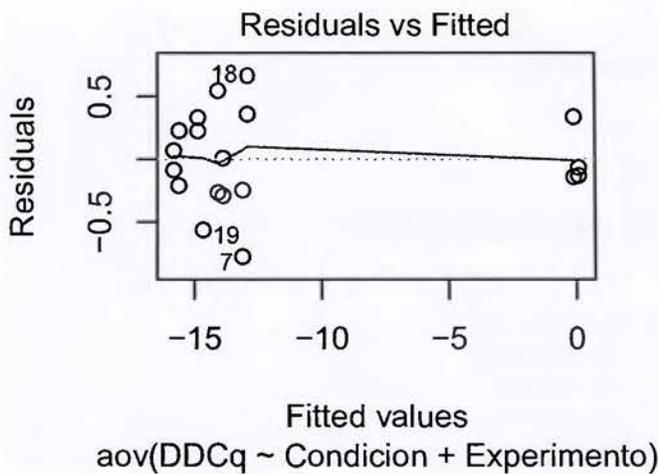
```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = TNFa)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    0.3564     0.2415   1.476  0.42326
## 18 - CP == 0    1.0903     0.2415   4.514  0.00207 **
## 25 - CP == 0    0.1553     0.2622   0.592  0.93592
## CN - CP == 0    6.5350     0.2415  27.056 < 0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

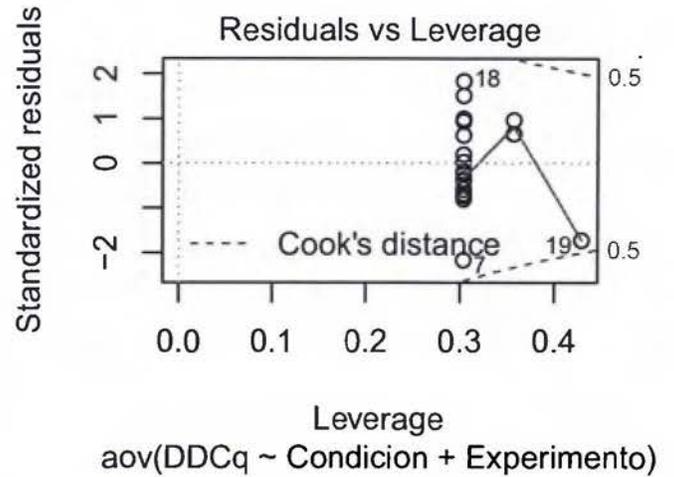
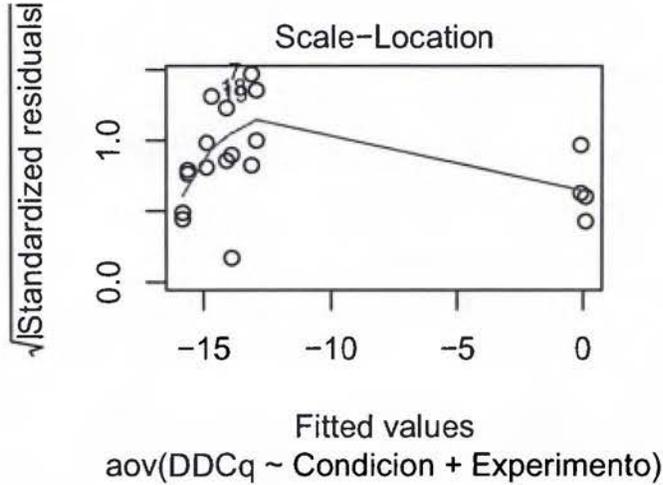
95% family-wise confidence level



2. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen IL1-β

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
## Condicion  4 666.33 166.583 891.0085 1.039e-15 ***
## Experimento  1  0.18  0.180  0.9642  0.344
## Residuals 13  2.43  0.187
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: IL1b.aov$res
## D = 0.10922, p-value = 0.9587
## alternative hypothesis: two-sided
```

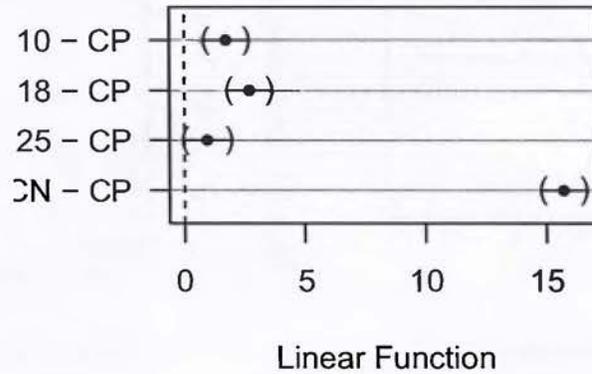
Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: IL1b$DDCq by IL1b$Condicion
## Bartlett's K-squared = 6.11, df = 4, p-value = 0.1911
```

Prueba de Dunnet para la comparación de medias

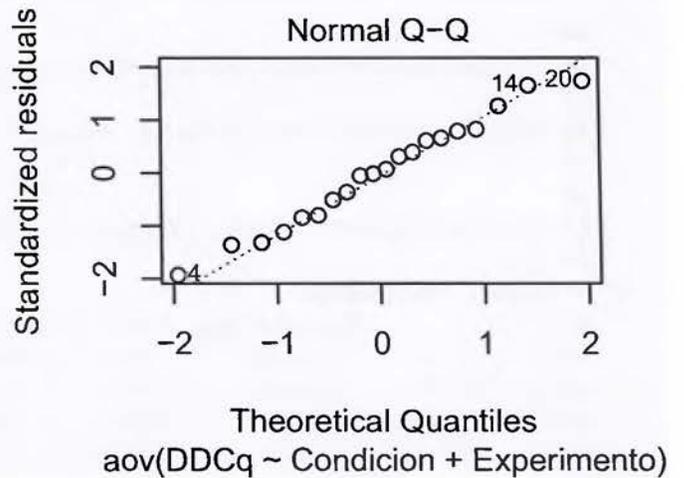
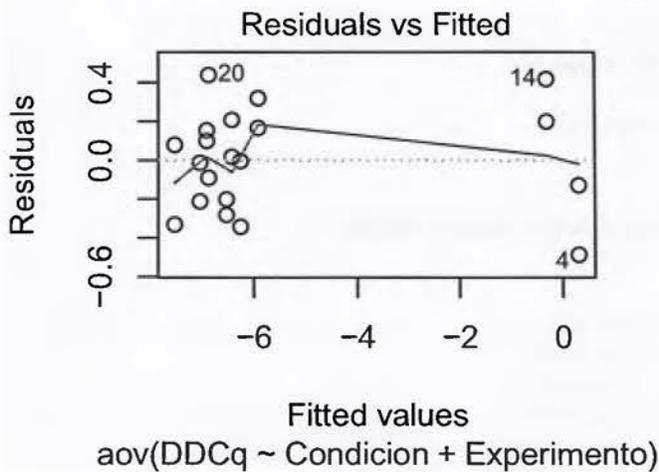
```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = IL1b)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    1.7408     0.3057   5.694 <0.001 ***
## 18 - CP == 0    2.7091     0.3057   8.860 <0.001 ***
## 25 - CP == 0    0.9513     0.3319   2.866  0.0428 *
## CN - CP == 0   15.7227     0.3057  51.424 <0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

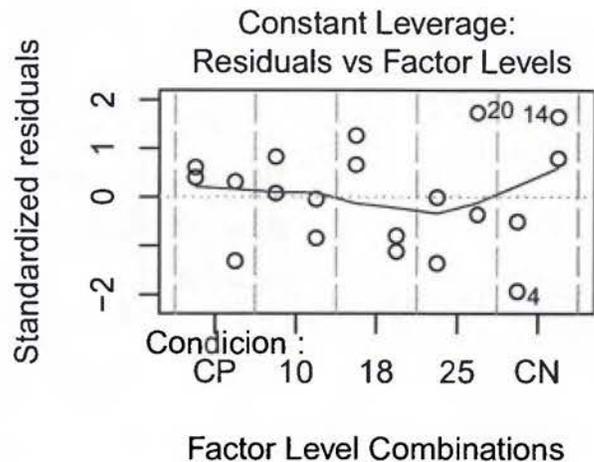
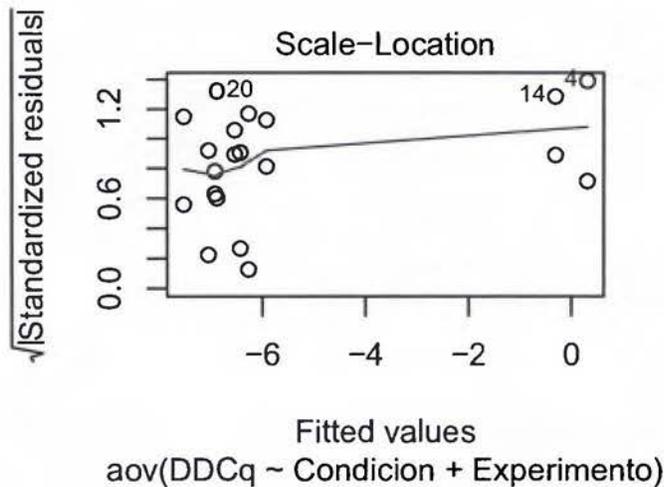
95% family-wise confidence level



3. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen CCL2

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Condicion  4 145.297  36.324 397.697 3.053e-14 ***
## Experimento  1   1.904   1.904  20.843 0.0004406 ***
## Residuals 14   1.279   0.091
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: CCL2.aov$res
## D = 0.082365, p-value = 0.9974
## alternative hypothesis: two-sided
```

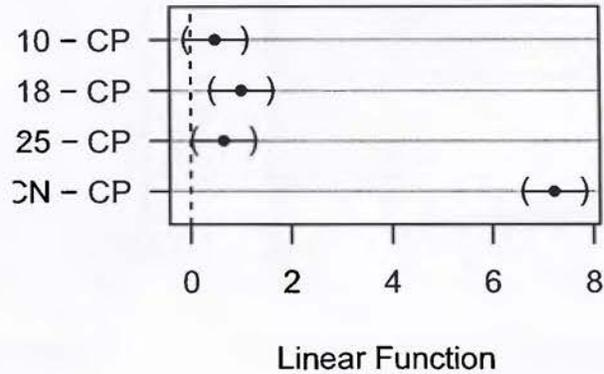
Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: CCL2$DDCq by CCL2$Condicion
## Bartlett's K-squared = 4.5647, df = 4, p-value = 0.3349
```

Prueba de Dunnet para la comparación de medias

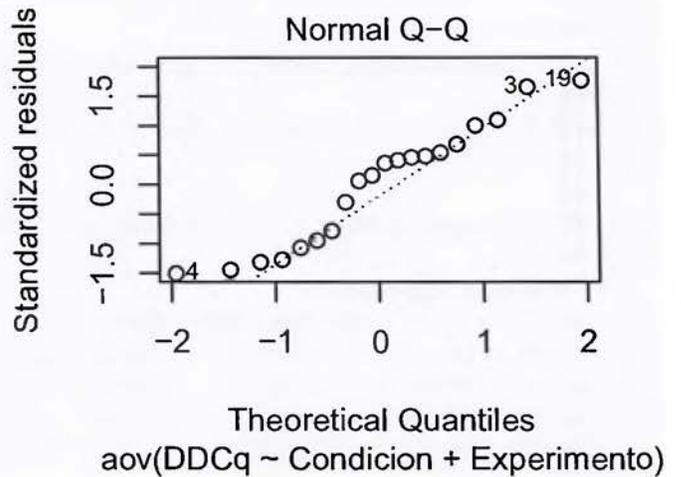
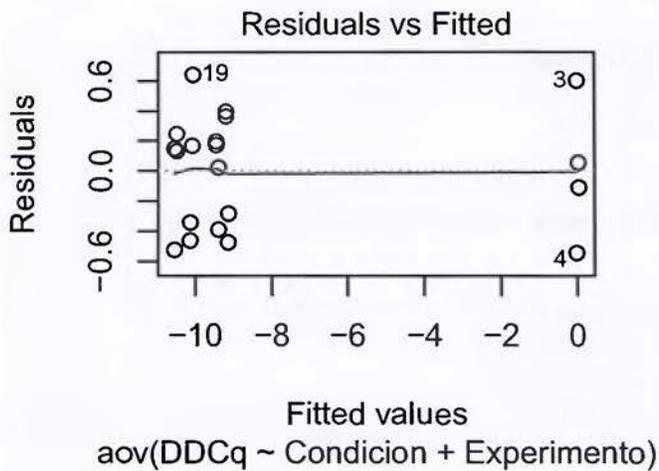
```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = CCL2)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    0.4889     0.2137   2.288 0.11552
## 18 - CP == 0    1.0009     0.2137   4.684 0.00126 **
## 25 - CP == 0    0.6552     0.2137   3.066 0.02732 *
## CN - CP == 0    7.2262     0.2137  33.815 < 0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

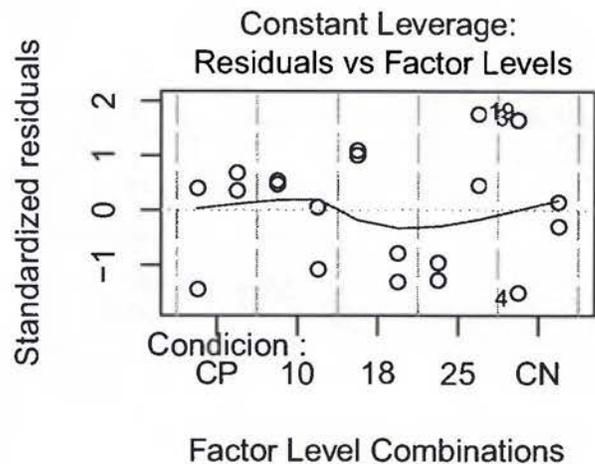
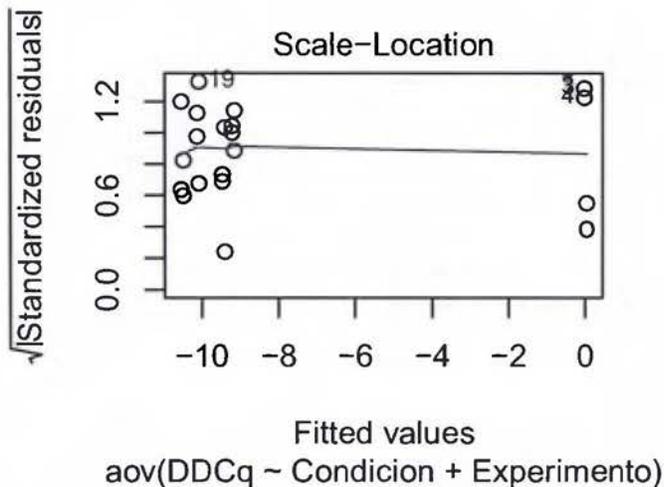
95% family-wise confidence level



4. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen CXCL2

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Condicion  4 312.234   78.059  414.7032 2.284e-14 ***
## Experimento 1   0.015    0.015   0.0798   0.7817
## Residuals 14   2.635    0.188
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: CXCL2.aov$res
## D = 0.13648, p-value = 0.8026
## alternative hypothesis: two-sided
```

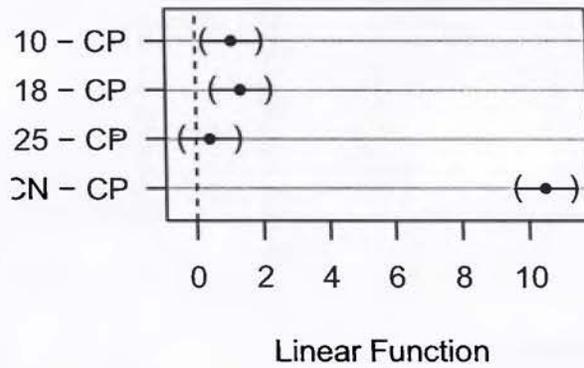
Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: CXCL2$DDCq by CXCL2$Condicion
## Bartlett's K-squared = 1.606, df = 4, p-value = 0.8077
```

Prueba de Dunnet para la comparación de medias

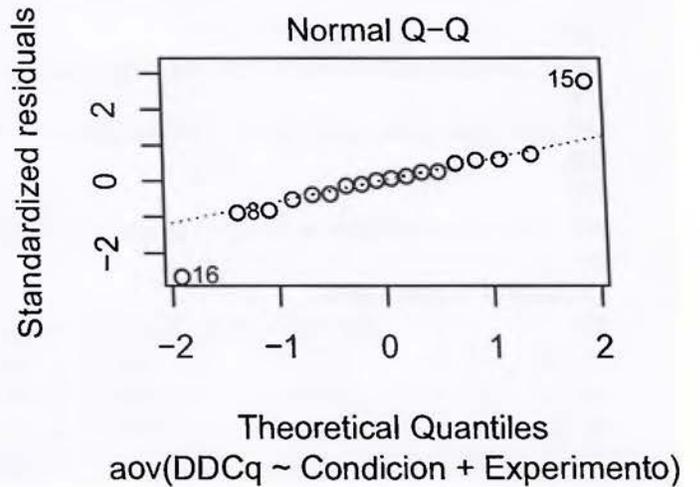
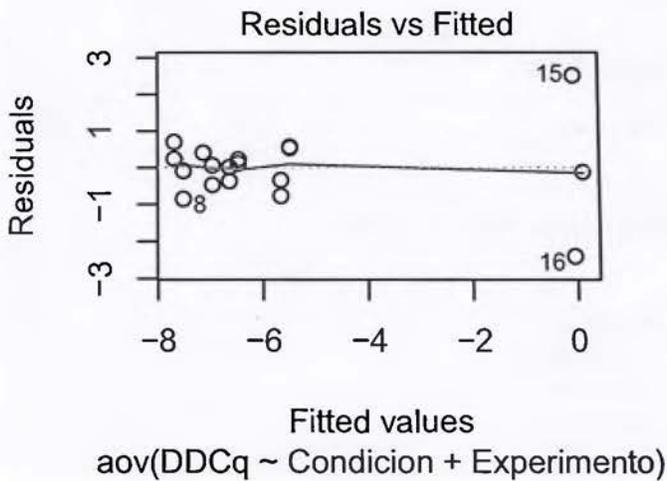
```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = CXCL2)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    1.0860    0.3068   3.540 0.01115 *
## 18 - CP == 0    1.3406    0.3068   4.370 0.00216 **
## 25 - CP == 0    0.4046    0.3068   1.319 0.50875
## CN - CP == 0   10.5136    0.3068  34.271 < 0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

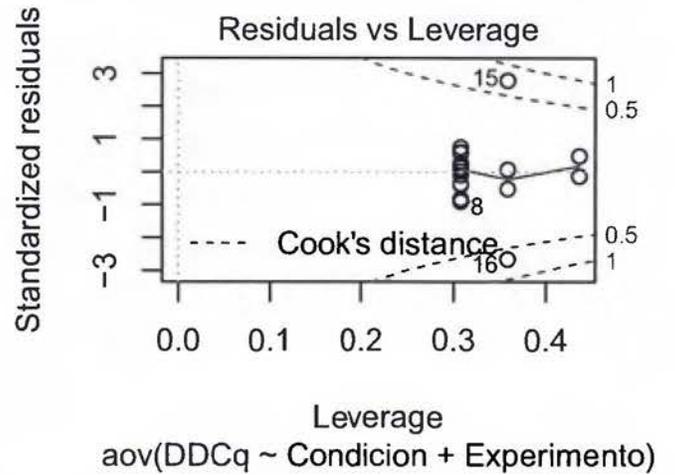
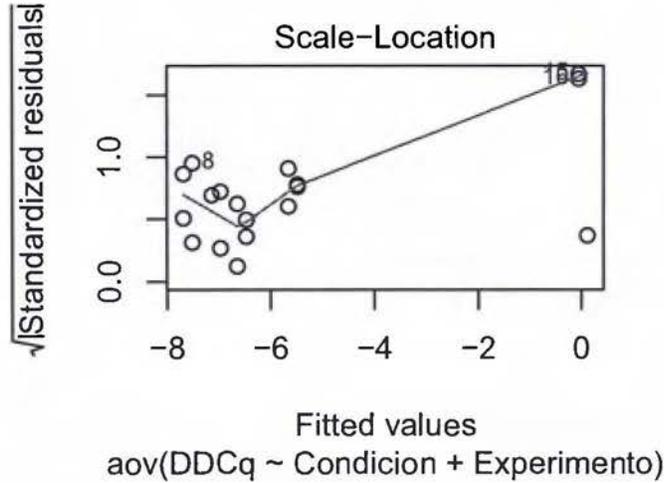
95% family-wise confidence level



5. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen IL-10

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Condicion  4 119.852  29.9630  23.4580 1.343e-05 ***
## Experimento 1   0.129   0.1287   0.1008   0.7563
## Residuals 12  15.328   1.2773
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: IL10.aov$res
## D = 0.17461, p-value = 0.583
## alternative hypothesis: two-sided
```

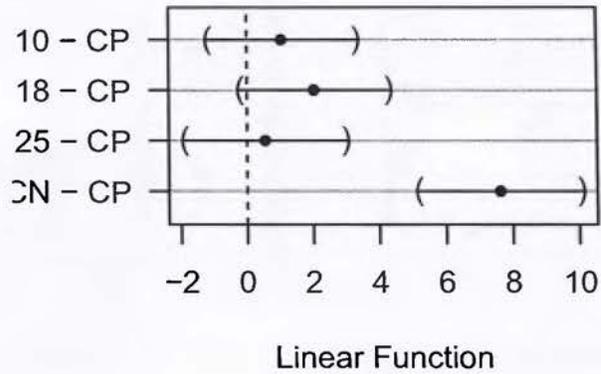
Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: IL10$DDCq by IL10$Condicion
## Bartlett's K-squared = 12.08, df = 4, p-value = 0.01677
```

Prueba de Dunnett para la comparación de medias

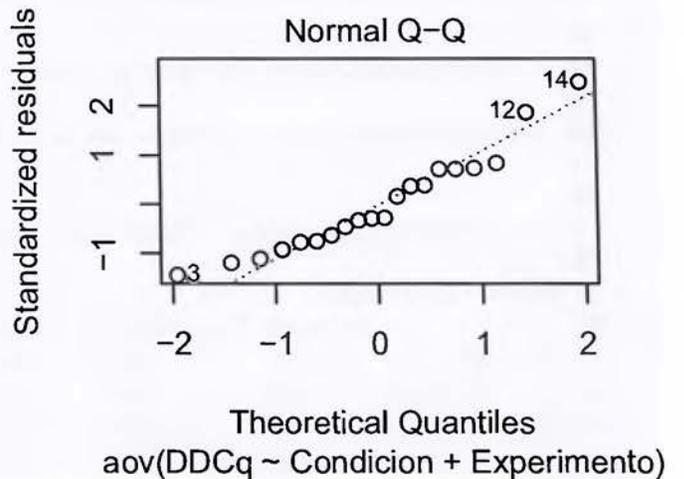
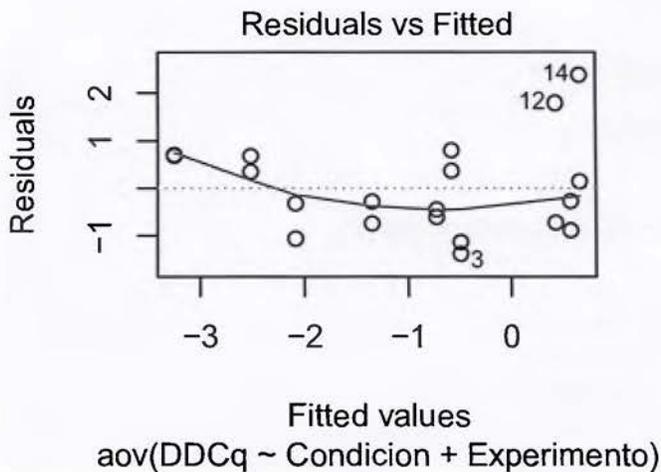
```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = IL10)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    1.0511     0.7992   1.315  0.5255
## 18 - CP == 0    2.0316     0.7992   2.542  0.0814 .
## 25 - CP == 0    0.5519     0.8679   0.636  0.9219
## CN - CP == 0    7.6337     0.8679   8.795 <0.001 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

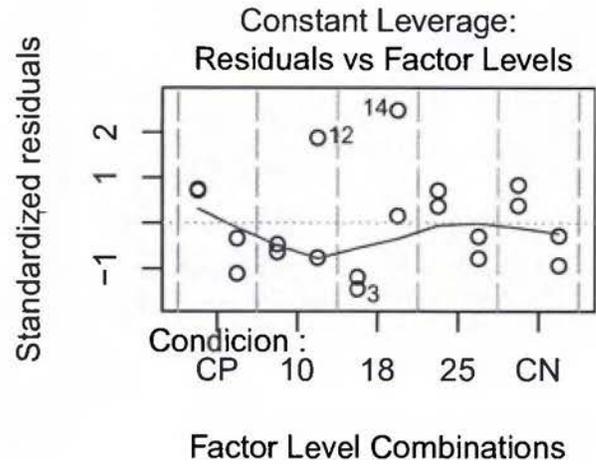
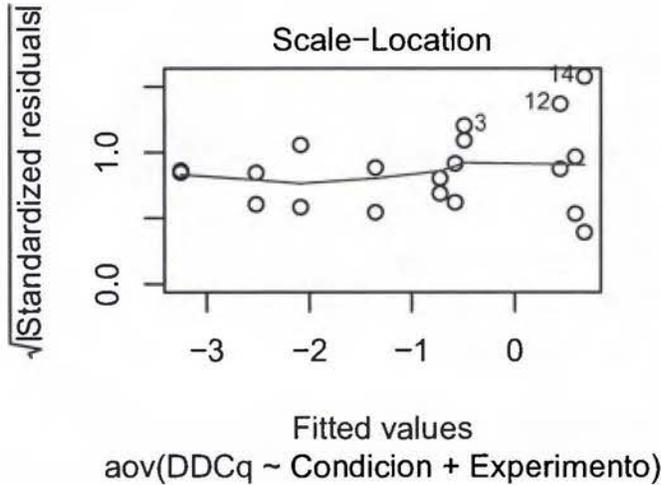
95% family-wise confidence level



6. Pruebas de supuestos y de significancia para el gen TGF- β

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: DDCq
##      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Condicion  4 26.2108  6.5527  5.0318 0.01003 *
## Experimento  1  6.7799  6.7799  5.2062 0.03867 *
## Residuals 14 18.2318  1.3023
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```





Prueba de normalidad

```
##
## One-sample Kolmogorov-Smirnov test
##
## data: TGFb.aov$res
## D = 0.15945, p-value = 0.6327
## alternative hypothesis: two-sided
```

Supuesto de homoscedasticidad

```
##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: TGFb$DDCq by TGFb$Condicion
## Bartlett's K-squared = 19.211, df = 4, p-value = 0.0007143
```

Prueba de Dunnet para la comparación de medias

```
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Dunnett Contrasts
##
## Fit: aov(formula = DDCq ~ Condicion + Experimento, data = TGFb)
##
## Linear Hypotheses:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## 10 - CP == 0    2.5237     0.8069   3.128  0.0244 *
## 18 - CP == 0    2.7581     0.8069   3.418  0.0138 *
## 25 - CP == 0    0.7341     0.8069   0.910  0.7740
## CN - CP == 0    2.6687     0.8069   3.307  0.0175 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)
```

95% family-wise confidence level

