

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y BIOMEDICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS DE
DIAGNOSTICOS E INVESTIGACION EN SALUD (SELADIS)



“EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE *Erythroxylum coca Lam*, *Equisetum giganteum L.*, *Croton lechleri Muell. Arg.*: ESTUDIO EN LA VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS HUMANOS”

Tesis para optar al título de Magister *Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Mención: Inmunología

Presentado por:

Lic. Ximena Padilla Lizarazu

La Paz – Bolivia

2022

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y BIOMEDICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS DE
DIAGNOSTICOS E INVESTIGACION EN SALUD (SELADIS)



“EFECTO INMUNOMODULADOR DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE *Erytroxylum coca Lam*, *Equisetum giganteum L.*, *Croton lechleri Muell. Arg.*: ESTUDIO EN LA VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS HUMANOS”

Tesis para optar al título de Magister *Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Mención: Inmunología

Presentado por:

Lic. Ximena Padilla Lizarazu

Tutor (es): Katty Terrazas Aranda, Ph.D.

Roger Carvajal Saravia Ph.D.

La Paz – Bolivia

2022

DEDICATORIA

A Dios, porque todo es posible con fe.

A mis amados padres: Humberto Padilla y Jeannette Lizarazu por su apoyo constante y porque me enseñaron a luchar siempre por mis metas y que todo en esta vida tiene solución.

A mi motor de vida, mi niño amado Ezequiel que me enseñó a ser fuerte por él y para él.

AGRADECIMIENTOS

A la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas 10ª versión la cual me brindó la oportunidad de hacer investigación y ver otro mundo en mi carrera.

El presente trabajo se realizó gracias al “Programa de fortalecimiento institucional” mediante la beca maestría y el programa de investigación “Infecciones tropicales virales de Transmisión Sexual” financiado por la cooperación Sueca en Bolivia DIPGIS-ASDI realizado en el laboratorio de las Unidades de Virología, Inmunidad e Infección y la Unidad de Biomedicina experimental del Instituto SELADIS.

Mi sincero agradecimiento a mi tutora Dra. Katty Terrazas Aranda por su comprensión, apoyo, paciencia, tolerancia, amistad, por haberme acogido en la Unidad de Virología y por haberme dado la oportunidad más fabulosa de mi vida de ir a cumplir un gran sueño a través del programa de intercambio ERASMUS para conocer Suecia. Siempre le estaré muy agradecida.

Mi eterna gratitud a mi tutor Dr. Roger Carvajal Saravia por todo el conocimiento brindado, el apoyo, paciencia con los errores gramaticales, y sobre todo su amistad, siempre le daré gracias por haberme permitido realizar mi trabajo de investigación en el Instituto SELADIS y apoyar en los proyectos paralelos en la unidad de Biomedicina.

Un agradecimiento especial a la Dra. Kristina Eriksson y a todo el equipo de investigación del Departamento de Reumatología e Inflamación del Instituto Sahlgrenska de la Universidad de Gotemburgo, que me enseñaron otra perspectiva de investigación y por los buenos momentos de “Fika”.

Agradecer a todas las personas que me colaboraron en Instituto SELADIS, Dra. Raquel Calderón, Dr. Sosa, docentes, internos y residentes que me ayudaron y colaboraron en mi investigación.

A la Dra. Esther Flores por la colaboración y paciencia con todos los problemas que se me presentaron y supo comprenderlos.

A mis compañeros y docentes de la Maestría con quienes compartí muchos momentos de estudio, de amistad y de apoyo.

A mis hermanos Marcelo y Sergio gracias por el apoyo, sé que siempre podremos contar uno con otro en esta vida.

A mi segunda familia que me adoptó en La Paz, Flia. Fernández Ovando me adoptaron como una hija más, siempre les estaré agradecida por cada día de apoyo, de aliento, y porque soy muy feliz de saber que siempre podré contar con ustedes y ustedes conmigo.

A la Familia Herbas Laguna les agradezco cada muestra de comprensión ante las adversidades, y su aliento constante de perseguir mis sueños. Un especial agradecimiento a José Herbas L. (mi boni) que supo entender mi pasión por la investigación y me mostró que con amor se puede lograr muchas cosas.

A los internos, residentes, y mis amigos de la Unidad de Virología, Cinthia M., Edith C., Farha M., Norah N., Julio V., Juan Pablo, Karen L., Wilma M., Fresia, esas mañanas y tardes de cumbias, almuerzos (chicharroncitos, chanchitos al horno), bebidas espirituosas compartidas son momentos que quedaran siempre, les agradezco por su amistad y su apoyo. Mi profunda y especial gratitud a Marianela Patzi Ph.D. por haberme ayudado, tanto en La Paz como en Suecia en todos los aspectos, te estaré eternamente agradecida Nelita.

RESUMEN

En Bolivia gran parte de la población usa plantas medicinales para tratar o prevenir enfermedades, por lo que es importante conocer específicamente sus efectos. La finalidad del presente trabajo es la de evaluar el efecto inmunomodulador *in vitro* de los extractos hidro-alcohólicos de *Erythroxylum coca Lam*, *Equisetum giganteum L*, y *Croton lechleri Muell. Arg*, sobre células polimorfonucleares y mononucleares de voluntarios humanos sanos.

Los resultados encontrados muestran que, a dosis de consumo humano (en el caso de *Erythroxylum coca Lam* equivalente al consumo de harina de coca indicado por la medicina tradicional) y de actividad antiviral (por estudios previos con uso de dosis de 10µg y 30µg para *Croton lechleri Muell. Arg*, y *Equisetum giganteum L*), no afectan la viabilidad de los leucocitos *in vitro*, la que se mantiene de 90 a 100%. *Erythroxylum coca Lam* estimula en un 16% más, respecto a los controles, la actividad de óxido-reductasas mitocondriales, en cambio, con *Equisetum giganteum L*, y *Croton lechleri Muell. Arg* no se vio afectado el funcionamiento mitocondrial. La capacidad fagocítica de levaduras y la quimiotaxis celular no mostraron modificaciones, con ninguno de los extractos. La capacidad para eliminar bacterias fagocitadas, tampoco se modificó.

E. giganteum L. mostró actividad pro-inflamatoria porque generó la estimulación de IL-1β e IL-6, liberación de TNF-α, e inhibición de INF-γ, por lo que aparentemente tendría efecto modulador de la respuesta Th1. *Croton lechleri Muell. Arg*. mostró estimulación de la producción de IL-1β, IL-6, TNF-α e inhibió INF-γ e IL-10. Por su parte, *E. coca Lam*. no mostró actividad pro-inflamatoria por IL-1β e IL-6, sin embargo, mostró esta actividad por inhibición de IL-10, y liberación de TNF-α.

Se concluye que, *E. giganteum* L, *Croton. lechlery* Muell.A. y *E. coca* Lam, mostraron actividad pro-inflamatoria dependiente de una respuesta Th1, compatible con un efecto favorecedor de la protección contra ciertas enfermedades a través del control de agentes infecciosos principalmente virus y parásitos intracelulares.

ABSTRACT

In Bolivia, a large part of the population uses medicinal plants to treat or prevent diseases, so it is important to know specifically their effects. The purpose of the present work is to evaluate the immunomodulatory effect in vitro of hydro-alcoholic extracts of *Erythroxylum coca* Lam, *Equisetum giganteum* L, and *Croton lechleri* Muell. Arg, on polymorphonuclear and mononuclear cells of healthy human volunteers. The results found show that, at doses of human consumption (in the case of *Erythroxylum coca* Lam equivalent to the consumption of coca flour indicated by traditional medicine) and antiviral activity (from previous studies using doses of 10 μ g and 30 μ g for *Croton lechleri* Muell. Arg, and *Equisetum giganteum* L), do not affect the viability of leukocytes in vitro, which is maintained from 90 to 100%. *Erythroxylum coca* Lam stimulates the activity of mitochondrial oxidoreductases 16% more than controls, while *Equisetum giganteum* L, and *Croton lechleri* Muell. Arg mitochondrial function was not affected. Yeast phagocytic ability and cell chemotaxis showed no changes with any of the extracts. The ability to eliminate phagocytized bacteria was also unchanged. *E. giganteum* L. showed pro-inflammatory activity because it generated IL-1 β and IL-6 stimulation, TNF- α release, and INF- γ inhibition, so it would apparently have a modulating effect on the Th1 response. *Croton lechleri* Muell. Arg. showed stimulation of IL-1 β , IL-6, TNF- α production and inhibited INF- γ and IL-10. *E. coca* Lam. did not show pro-inflammatory activity by IL-1 β and IL-6, however, it showed this activity by inhibition of IL-10, and TNF- α release.

It is concluded that *E. giganteum* L, *Croton lechleri* Muell. and *E. coca* Lam. showed pro-inflammatory activity dependent on a Th1 response, compatible with a protective effect against certain diseases through the control of infectious agents, mainly viruses and intracellular parasites.

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
3.	MARCO TEORICO.....	4
3.1	Fagocitosis.....	4
3.2	Actividad microbica.....	6
3.3	La activación de los fagocitos.....	10
3.4	La quimiotaxis.....	12
3.5	Las citoquinas.....	15
3.6	Inflamasoma.....	30
3.7	Equisetum giganteum L.	40
3.8	Croton lechlerii Müll.Arg. -	42
3.9	La Hoja de Coca (Erythroxyllum coca).	44
4	JUSTIFICACIÓN.....	48
5	OBJETIVOS.....	50
5.1	Objetivo General.....	50
5.2	Objetivos Específicos.....	50
6	METODOLOGIA.....	51
6.1	Diseño experimental.....	52
6.2	Material vegetal.....	52
6.3	Donantes voluntarios.....	54
6.4	Separación y obtención de células.....	54
6.5	Viabilidad celular por exclusión con azul tripán.....	55
6.6	Ensayo con sal de Tetrazolio MTT.....	56
6.7	Determinación de la actividad Quimiotactica.....	59
6.8	Ensayo de capacidad endocítica.....	61
6.9	Ensayo de capacidad microbica.....	63
6.10	Detección de citoquinas.....	65
6.11	Ensayo de actividad de Inflamasoma.....	66

6.12	Actividad de Caspasa-1 por FACS.....	66
6.13	Expresión de ARNm de NLRP3 y AIM2.....	67
6.14	Medición de LDH.....	68
6.15	Medición de ROS.....	68
7	ANALISIS ESTADISTICO.....	70
8	RESULTADOS.....	70
9	DISCUSIÓN	102
10	CONCLUSIONES.....	117
11	BIBLIOGRAFÍA.....	119

Índice de Figuras

Figura 1 Localización de TLR4 y TLR3.....	11
Figura 2. <i>Equisetum giganteum</i> material vegetal y Mapa de Distribución potencial en Bolivia.....	40
Figura 3. Croton lechery material vegetal.....	42
Figura 4. <i>Eryroxylum coca</i> planta y mapa de distribución.....	44
Figura 5. Reacción de Reducción de MTT	58
Figura 6.- Placa de gel-agarosa con la localización de distribución de los elementos en los pozos.....	61
Figura 7 Evaluación in vitro de la viabilidad de células mononucleares por el método de exclusión con azul tripán.....	71
Figura 8 Evaluación in vitro de la viabilidad celular de polimorfonucleares por el método de exclusión con azul tripán.....	72
Figura 9 Evaluación in vitro del efecto de los extractos estudiados sobre la actividad enzimática mitocondrial y citoplasmáticas de células mononucleares con la sal de tetrazolio MTT.....	74
Figura 10 Evaluación in vitro del efecto de los extractos estudiados sobre la actividad enzimática mitocondrial y citoplasmáticas en células polimorfonucleares con la sal de tetrazolio MTT.....	76
Figura 11 Evaluación in vitro de la capacidad endocítica de levaduras por células mononucleares.....	77
Figura 12 Evaluación in vitro de la capacidad endocítica de levaduras por células polimorfonucleares.....	78
Figura 13. Evaluación <i>in vitro</i> de la migración de polimorfonucleares.....	80
Figura 14 Observación de la Migración de polimorfonucleares desde el pocillo de origen hacia el péptido quimiotactico.....	81
Figura 15 Evaluación de la capacidad microbicida de células mononucleares.....	82
Figura 16 Evaluación de la capacidad microbicida de células polimorfonucleares.....	84
Figura 17 Evaluación de IL-1 β en células mononucleares.....	86

Figura 18 Evaluación de interleucina 6 en células mononucleares.....	87
Figura 19. Evaluación de interleucina 8 en células mononucleares.....	88
Figura 20 Evaluación de interleucina 10 en células mononucleares.....	90
Figura 21 Evaluación de la liberación de TNF- α por células mononucleares.....	91
Figura 22 Evaluación de la liberación de interferón gamma en células mononucleares...	93
Figura 23 evaluación de la liberación de IL-1 β con activadores de Inflamasoma.....	94
Figura 24 evaluación a través de la secreción de IL-1 β , la liberación de LDH y la expresión de la activación del Inflamasoma AIM2 y NLRP3 in vitro en células PBMC.....	95
Figura 25 evaluación a través de la secreción de IL-1 β , la liberación de LDH y la expresión de la activación del Inflamasoma AIM2 y NLRP3 in vitro en neutrófilos.....	96
Figura 26 Evaluación de la inhibición de la actividad de Caspasa 1.....	97
Figura 27 Inhibición de las ROS extracelulares inducidas por el fMLP con los extractos....	99
Figura 28 Producción/liberación de aniones superóxido en neutrófilos.....	100
Figura 29 Inhibición intracelular de aniones superóxido en neutrófilos.....	101

Índice de Anexos

Anexo 1 identificación del material vegetal por parte del Herbario Nacional de Bolivia.....	127
Anexo 2 Productos generados de la tesis	129

Abreviaciones

- PAMPS = patrones moleculares asociados a patógenos
- DAMPS = patrones moleculares asociados al daño
- MPRR = Receptores de reconocimiento de Patrones Moleculares
- TLR = Receptores tipo Toll
- MPO = Mieloperoxidasa
- SOD = superóxido dismutasa
- ROS = Especies Reactivas de Oxígeno
- fMLP o fMLF = N-formyl-1-metyonil-1-leucyl-1-fenilalanina
- AIM2 = Ausentes en los receptores tipo melanoma 2
- NOD o NLR = Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos
- PYD = Dominio de Pirina N-terminal
- ASC = proteína asociada a la apoptosis
- NLRP3 = dominios NOD, LRR y pirina que contiene Proteína 3
- LPS = Lipopolisacárido
- NAD = nicotinamida adenina dinucleótido
- LDH = lactato deshidrogenasa
- DMSO = Dimetilsulfóxido
- MTT = bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
- UFC = unidades formadoras de colonias
- ELISA = ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- poly dA: dT = Sal sódica del ácido polidesoxiadenílico-timidílico
- FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting
- GAPDH = gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
- PMA = ácido forbol mirístico
- HRP = peroxidasa de rábano
- Cpm = cuentas por minuto
- BC = buffy coat

1. INTRODUCCION

En Bolivia gran parte de la población urbana y muchas poblaciones étnicas utilizan la medicina tradicional para prevenir o curar enfermedades. En las poblaciones indígenas, que ocupan una gran extensión de nuestro territorio, existe un sistema de salud tradicional, que ha persistido históricamente, transformándose y adaptándose a los tiempos, pero manteniéndose firme a través de sus creencias ancestrales expresadas en la tradición oral, símbolos, pensamientos sólidos y profundos. La medicina tradicional, ha tenido resultados positivos debido a una larga experiencia acumulada y transmitida de generación en generación, y tiene su validación precisamente en la práctica; como todo sistema médico es parte de la cultura, es influenciada por la economía, religión, relaciones sociales, educación, estructura familiar y el idioma, que determinan cambios e interrelaciones con los otros sistemas. **LINEAMIENTOS ESTRATÉGICOS DE MEDICINA TRADICIONAL E**

INTERCULTURALIDAD EN SALUD“ .) Dentro de los usos más comunes de las plantas se encuentran las que se usan para trastornos gastrointestinales, afecciones de la piel, y también por sus efectos antiinflamatorios y anti-infecciosos (Ministerio de Salud,2016). A través del tiempo se han realizado diversos estudios científicos sobre las plantas con la finalidad de contar con mayores recursos para un uso farmacológico-medicinal, además de revalorizar la medicina tradicional.

El sistema inmunológico está involucrado en muchas enfermedades, incluyendo aquellas condiciones que no eran tradicionalmente consideradas infecciosas, inflamatorias o autoinmunes tales como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y metabólicas. En ese contexto, la inmunomodulación es ahora una parte crítica de la ciencia farmacológica.

En la Amazonia existen muchas plantas con distintas propiedades y formas de uso, para diversas enfermedades, de las cuales muchas propiedades podrían estar intrínsecamente ligados a la inmunidad. Existe la idea general que los diversos efectos reportados sobre estas plantas pueden deberse a la regulación del sistema inmune, lo que incidiría sobre los diferentes componentes del organismo. En este sentido, se puede advertir que el conocimiento del efecto de las plantas sobre la inmunidad, podría dar directrices para futuros estudios acerca de los trastornos del sistema inmune, como principal herramienta en la resolución y prevención de enfermedades.

Existen más de 65 especies vegetales ampliamente conocidas en la Amazonia por sus propiedades de uso para diferentes fines (Bourdy 2000). En el presente proyecto se evalúa la capacidad moduladora, de tres plantas de la Cuenca Amazónica boliviana: *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), *Croton lechlery* Müll.Arg (Sangre de Grado) y *Erythroxylum coca* Lam. (coca), mediante el estudio de los principales componentes de la inmunidad innata. Las primeras se conocen por tener una potente actividad antiviral (Churqui,2018) y la última es muy conocida por diversos usos reportados por la medicina ancestral y tradicional en lo relacionado con trastornos inflamatorios y el manejo del dolor (Rojas, 2013). Los parámetros que se evaluaron fueron realizados *in vitro* en laboratorio. Estos fueron: los efectos en la viabilidad celular, la funcionalidad, la producción de moléculas de respuesta inmunológica, y la activación de vías inflamatorias, en leucocitos de sangre periférica humana. El propósito se inscribe en la perspectiva de generar directrices que nos permitan conocer más acerca de los efectos negativos o positivos de estos productos

naturales, como parte de los estudios de los diferentes mecanismos de acción terapéutica y, de esta manera, trazar la perspectiva de contar con recursos farmacéuticos seguros.

2. ANTECEDENTES

La respuesta inmune humana se divide en dos vertientes: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (o adquirida). El estudio de la inmunidad innata se remonta al menos a los esfuerzos de Ilya Mechnikov, ganador de Premio Nobel en 1908 entre otros. Sin embargo, los recientes hallazgos de cómo el sistema inmune innato detecta la infección [en el caso de la respuesta innata reconoce PAMPS (patrones moleculares asociados a patógenos) y DAMPS (patrones moleculares asociados al daño) para potenciar la protección, han precipitado un renacimiento del estudio de esta fase de la inmunidad. Una de las principales características de la inmunidad innata es la velocidad de respuesta que se genera ante la exposición a un organismo extraño, así como las estrategias a través de receptores y células efectoras que utiliza, los cuales son importantes mecanismos para reconocer incluso aquellos patógenos que han modificado su estructura para evadir la respuesta inmune. Además, resalta la gran capacidad de discriminar lo propio de lo extraño, para determinar que todo en el sistema está en funcionamiento homeostático. (Turvey y Broide 2010)

Dentro de las principales funciones medibles de los componentes de la inmunidad innata para lograr el reconocimiento y la eliminación de partículas extrañas, se consideran como fundamentales: la *fagocitosis*, la *quimiotaxis* y la *capacidad de eliminar microorganismos a través del estallido respiratorio*.

Recientemente se han estudiado otros mecanismos de defensa de la inmunidad innata principalmente en respuesta a virus, entre estos destaca el proceso de activación de una importante red de proteínas y vías de señalización denominado **Inflamasoma**, que juega un rol importante en la respuesta innata y contribuye al control celular y reparación tisular.

3. MARCO TEORICO

3.1 LA FAGOCITOSIS

La fagocitosis se ha definido como la ingestión de partículas ($\geq 0.5\text{-}\mu\text{m}$) por células; este proceso requiere de energía, que proviene de una fuente de carbohidratos adecuados y una vía glucolítica funcional, requisito previo para la captación eficiente de partículas. Este fenómeno implica el reconocimiento y la unión de cuerpos extraños por receptores en la superficie celular. Cuerpos extraños como las bacterias u hongos pueden ser eliminados de sitios de infección por fagocitos profesionales como los neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas (Kress, Stelzer y Cols. 2007, Flannagan, Jaumouillé y Cols. 2012).

Los fagocitos expresan diversos receptores sobre su superficie que reconocen de manera directa componentes moleculares conservados, específicos, sobre la superficie de microorganismos, como componentes de la pared celular de bacterias y hongos. Sin embargo, la activación de la fagocitosis también puede ocurrir de manera indirecta mediante el reconocimiento de proteínas solubles que se han unido a superficies microbianas, lo que aumenta la fagocitosis, un proceso llamado opsonización. Las opsoninas también se unen a componentes repetitivos, conservados, sobre las superficies de microorganismos, como estructuras de carbohidratos, lipopolisacaridos, y proteínas virales que se denominan proteínas de reconocimiento de patrones solubles.

Los receptores opsonicos tienen receptores de alta afinidad para ciertas opsoninas como: moléculas de anticuerpos, proteínas del complemento y lectinas plasmáticas; los receptores no opsonicos incluyen receptores tales como la lectina tipo C.

Una vez adheridas las partículas a través de los receptores de reconocimiento, la fagocitosis implica un proceso de internalización y endocitosis de múltiples ligandos, lo que refleja sus diversas funciones. Comienza con el reconocimiento del objeto, es decir, la unión de un receptor fagocítico a su ligando afín (especificidad relativa). Las partículas extrañas y las células propias alteradas son los dos objetivos principales de la fagocitosis. (Flannagan, Jaumouillé y Cols. 2012, Gordon 2016, Lim, Grinstein y Cols. 2017).

Entre los Receptores que se involucran en la detección de estructuras extrañas se encuentran los “Receptores de reconocimiento de Patrones Moleculares (MPRR por sus iniciales en inglés)” los cuales reconocen bacterias, hongos y parásitos que expresan cierto tipo de moléculas que constituyen un patrón propio de los microorganismos. Estos pueden ser reconocidos por distintos receptores principalmente los llamados de tipo Toll (Toll Like Receptors o TLR).(Flannagan, Harrison y Cols. 2010, Jaumouillé and Grinstein 2011).

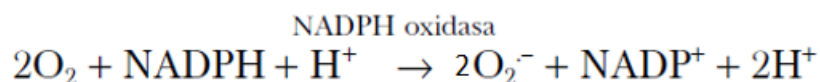
A través del tiempo los microorganismos fueron adquiriendo mecanismos y estrategias para evadir la fagocitosis. La estrategia más común es interferir con la unión de las opsoninas. Varias especies bacterianas y fúngicas sintetizan cápsulas de polisacáridos que impiden la opsonización. Algunos patógenos expresan proteínas específicas de la superficie que inhiben la unión al receptor(Fischetti 1989, Flannagan, Jaumouillé y Cols. 2012).

En el proceso de fagocitosis la señalización positiva conduce a la formación de la copa fagocítica dependiente de actina y la extensión de los pseudopodios alrededor del ligando,

que favorece la internalización de las partículas reconocidas. Luego de la internalización de las partículas se da la formación de una vacuola unida al fagosoma que contiene un medio hostil producto de la alteración de la actividad metabólica de los fagocitos con acumulación de ácido láctico dentro del fagosoma y disminución de pH en las vacuolas fagocíticas, hecho poco tolerado por microbios y adecuado para la degradación de la partícula internalizada. Este se vuelve marcadamente ácido (pH luminal ≈ 4.5), altamente oxidativo y enriquecido con enzimas hidrolíticas. Para esto, después de la formación del fagosoma se da la fusión con los lisosomas para formar el orgánulo microbicida denominado fagolisosoma, el cual se convierte en el organelo degradativo en el que se pueden digerir proteínas, lípidos y carbohidratos. La impresionante capacidad destructiva del fagolisosoma se atribuye a la concertada actividad de numerosos efectores, incluyendo diversas enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes y péptidos catiónicos.

3.2 LA ACTIVIDAD MICROBICIDA

La captación fagocítica de bacterias por los neutrófilos y macrófagos, tiene la capacidad de inducir la activación de un potente proceso de consumo de oxígeno extra-mitocondrial denominado *estallido oxidativo*. Durante este proceso, el consumo de oxígeno por los neutrófilos puede aumentar hasta 100 veces la cantidad basal de actividad metabólica. El sistema enzimático responsable es un complejo NADPH-oxidasa que se ensambla en la membrana.

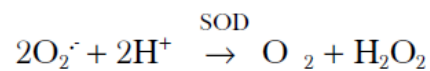


Una propiedad importante del complejo NADPH-oxidasa es que el flujo de electrones es direccional, desde el NADPH en el citosol hasta el oxígeno en la superficie externa de la membrana. Por lo tanto, el superóxido producido se liberará extracelularmente cuando el NOX2 esté en la superficie celular, pero cuando la actividad se localiza en las membranas internas, como los fagosomas, este se liberará en la vesícula cerrada. La naturaleza direccional de la actividad de NOX2 también crea un desequilibrio de carga que debe ser contrarrestado para evitar la despolarización de la membrana y el cierre de la actividad. Además, los protones se producen en el citosol y se consumen en el compartimento externo (por ejemplo, el fagosoma) a través de la dismutación del superóxido. Ambas situaciones son superadas en gran medida por un flujo de equilibrio de protones transportados por canales de protones dependientes de voltaje, principalmente HV1, proteína de dominio solamente de detección de voltaje (VSOP), que se activa en paralelo con la oxidasa. Con el flujo equilibrante de protones, la carga negativa en el fagosoma se disipa mediante la dismutación del anión superóxido y se supera la acidificación citoplásmica debida a la oxidación del NADPH (Winterbourn and Kettle 2012).

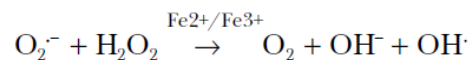
El pH del fagosoma está regulado por estas actividades. La mayoría de esta actividad está localizada en la membrana fagosómica, dirigiendo así el superóxido al espacio fagosómico. Cuando un neutrófilo reconoce partículas para la ingestión, la membrana plasmática se invagina, formando, primero, una copa y, luego, un fagosoma cerrado. Esto ocurre extremadamente rápido (en aproximadamente 45 s) y las subunidades NOX2 se ensamblan antes de que el fagosoma esté completamente formado. Los gránulos intracelulares se fusionan con el fagosoma en desarrollo, liberando Mieloperoxidasa (MPO) y una gran

cantidad de enzimas digestivas. La mayoría de las moléculas de NOX 2 está asociada con membranas específicas de gránulos, y el resto está en la membrana plasmática, por lo que el NOX2 activo se incorpora al fagosoma a medida que los gránulos y las membranas plasmáticas se fusionan.

Otro compuesto importante es el peróxido de hidrógeno que es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

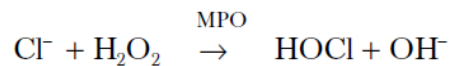


Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipofilicidad lo que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios. El radical hidroxilo es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad, y suele actuar en los sitios cercanos a donde se produce. La formación del radical hidroxilo puede lograrse fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno catalizada por un metal de transición, en este caso el Fe.



Los oxidantes más relevantes producidos por los neutrófilos, además del superóxido y el peróxido de hidrógeno, son los generados por la MPO (mieloperoxidasa). Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar una amplia gama de sustratos a productos reactivos.

Estos últimos incluyen oxidantes no radicales, los principales son los ácidos hipocloroso e hipotiociano, así como los radicales producidos a partir de sustratos orgánicos e inorgánicos. La producción de estos oxidantes (ROS o Especies Reactivas de Oxígeno) es crítica para una defensa antimicrobiana efectiva. Los neutrófilos y otros fagocitos profesionales fueron las primeras células que se mostraron con actividad NADPH oxidasa. El ácido hipocloroso es el oxidante antimicrobiano de acción más rápida y más potente producido por los neutrófilos, y la mayor parte de la evidencia apunta a que es el principal responsable de la destrucción oxidativa (Winterbourn, Kettle y Cols. 2016).



La producción de pequeñas cantidades de ROS forma parte del metabolismo celular que actúa como regulador de procesos activados por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otros estímulos. Sin embargo, la producción incontrolada de ROS altera o destruye componentes celulares y modifica la expresión de genes.

Para una fagocitosis eficiente, los neutrófilos primero tienen que salir del torrente sanguíneo y migrar al sitio de la infección, proceso en el que responden a la presencia de sustancias atrayentes y que es denominado *Reclutamiento de Neutrófilos*. La entrada y replicación de los patógenos en los tejidos del huésped conducen a la síntesis y liberación de productos microbianos, tales como formil péptidos, lipoproteínas, y peptidoglicano. Además, el patógeno invasivo también puede dañar a los tejidos corporales lo que produce señales inflamatorias, que operan como quimioattractantes, y un grupo químicamente

diverso de señales de guía molecular (por ejemplo, lípidos, péptidos N-formilados, complemento, anafilotoxinas y quimiocinas) (Winterbourn, Kettle y Cols. 2016).

3.3 LA ACTIVACION DE LOS FAGOCITOS

Para el reconocimiento de agentes externos el sistema inmune usa los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) dentro de los que se encuentran los receptores de tipo Toll o TLR que son proteínas transmembrana. Existe al menos 10 TLR identificados en humanos estos son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 que están presentes en la membrana plasmática mientras que TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10 están dentro de la célula en varios compartimentos, cada uno equipado con la capacidad de reconocer diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Las señales transducidas a través de los TLR causan la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias, moléculas coestimuladoras, y factores quimiotácticos que promueven respuestas inflamatorias que llevan a los macrófagos y neutrófilos a los sitios de inflamación (Kawasaki and Kawai 2014). La señalización a través de receptores TLR se desencadena por la dimerización de dichos receptores inducida por los ligandos. Posteriormente, el dominio del receptor Toll / IL-1 (TIR) de los TLR se une a las proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR, como la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) o la proteína adaptadora (que contiene el dominio TIR) que induce la síntesis de IFN- β (TRIF). Dependiendo del tipo de adaptador que está activado, varias quinasas [IRAK4 (quinasa 4 asociada al receptor de interleucina-1), IRAK1, IRAK2, TBK1 (quinasa 1 que se une a TANK (activador de NF asociado a miembros de la familia TRAF) e IKK ϵ (Inhibidor de κ B quinasa ϵ)] y ubiquitin ligasas [TRAF6 (El factor 6 asociado al receptor de TNF)] se reclutan y

3.4 LA QUIMIOTAXIS

En respuesta a la señal del receptor, los neutrófilos responden a estos estímulos, extravasando de los vasos sanguíneos y migrando hacia el sitio de la infección en un proceso denominado diapédesis. Los receptores péptido-formilo 1 (FPR1) y sus homólogos FPR2 pertenecen a la familia GPCR (receptor acoplado a proteínas G), reconocen proteínas N-formiladas y péptidos (formil-methionyl-leucyl-phenylalanina) producidos y liberados por los microorganismos; en consecuencia, inducen y potencian la quimiotaxis, la fagocitosis y la generación del estallido oxidativo en neutrófilos. La quimiotaxis se refiere a la capacidad de las células para detectar la dirección de los gradientes químicos externos de concentración y responder para polarizar y migrar con cierta precisión hacia la fuente de los quimio-atractantes o alejarse de la fuente de otras moléculas denominadas quimio-repelentes. Esto es crucial para el correcto funcionamiento de la inmunidad innata, tanto en organismos unicelulares, como en sistemas multicelulares (Xiong and Iglesias 2010).

En ausencia de una señal externa, los neutrófilos también pueden moverse y esta migración aleatoria y no direccional es conocida como quimiocinesis o migración al azar. Los neutrófilos responden a múltiples quimio-atractantes que son secretados por diferentes fuentes microbianas y no microbianas. Estos muestran gran diversidad química y, en función de dicha estructura química, se puede dividir en cinco familias: lípidos, péptidos N-formilados, complemento, anafilotoxinas y quimiocinas. La quimiotaxis de los neutrófilos se caracteriza por tres procesos: detección de gradiente, polarización y motilidad celular. Para la locomoción, las células desarrollan distintos conductos y bordes finales, y esto implica una distribución asimétrica de múltiples proteínas contráctiles del citoesqueleto y lípidos

que conduce a la reorganización celular interna y cambios en la morfología celular. La célula se mueve a través de una serie de ciclos regulados de pseudópodos, extensiones de lamelópodos y retracciones que hacen que el cuerpo de la célula se traslade hacia lo largo de un gradiente de concentración (Snyderman and Goetzl 1981, Teng, Ji y Cols. 2017, Petri and Sanz 2018).

Un quimioattractante de interés para este trabajo es el péptido N-formyl-1-metyonil-1-leucyl-1-fenilalanina (fMLP o fMLF) el cual es generado ya sea por bacterias o por fraccionamiento o transformación química de otros péptidos N-formilados. Como se mencionó antes, estos péptidos se reconocen a través de los receptores de péptido formilo, FPR1/ 2/3; solo FPR1 y 2 se expresan en neutrófilos humanos. Un gradiente quimiotáctico dará a los neutrófilos básicamente dos tipos de información para guiar la célula a su fuente: una posición basada en la concentración y un vectorial basado en la capacidad de los neutrófilos para detectar la dirección del gradiente (avanza hacia donde está más concentrado, o sea, hacia la fuente). Este concepto, junto con el hecho de que el neutrófilo tiene que ser capaz de “sentir”, transducir y finalmente transformar esta información en mecanismos mediadores de polaridad y locomoción, fue establecido desde el principio en el campo de la biología de los neutrófilos y la quimiotaxis (Thomas, Kleist y Cols.2018). Tras la exposición a fMLP, en pocos minutos los granulocitos desarrollan una superficie característica “rizada” y puede adquirir una forma alargada (“polarizado”). Cuando un gradiente de concentración de quimio-attractante está presente, son capaces de migrar hacia el gradiente, exhibiendo un lamellipodium en la parte anterior del borde y un uropodo en el borde posterior.

Tras la estimulación con fMLP el microfilamento se modifica y en consecuencia aumenta el tamaño de la célula. Las modificaciones en el citoesqueleto de actina pueden, al menos en parte, dar cuenta de la "polarización" de la célula, mientras que la motilidad de la célula probablemente requiere una alternativa de Ciclos de polimerización y despolimerización de la actina local (con adhesión y des-adhesión). La estimulación con fMLP, además de determinar las respuestas "principales" resumidas antes, tiene otros efectos, directos e indirectos, menos estudiados; destaca: la activación de la fosfolipasa-D (PLD), que inicia una señalización distinta, una cascada que posiblemente inicie conexiones con las otras principales cascadas de transducción iniciadas (Panaro y Mitolo 1999, Thomas, Kleist y Cols. 2018).

La actividad del péptido sobre los neutrófilos muestra que (i) los enlaces amídicos están involucrados, aunque con importancia variable, en la unión de los formil-péptidos al receptor; (ii) la capacidad de activar la respuesta de los neutrófilos humanos no se debe estrictamente a la presencia del grupo formilo; (iii) el residuo Met tiene una dimensión estrecha y lleva una carga positiva localizada a una distancia bien definida del esqueleto peptídico y está orientado en una posición específica, rodeando la mayor parte de la cadena lateral localizada internamente; (iv) el residuo Met es esencial para activar la quimiotaxis, pero las sustituciones específicas pueden introducir selectividad hacia los mecanismos de muerte, que pueden ser fuertemente estimulados; (v) residuos hidrofóbicos en la posición 2 son decisivos únicamente para la quimiotaxis, que se suprime al introducir aminoácidos hidrófilos mientras, que tanto la producción de aniones superóxido como las enzimas líticas lisosomales, son fuerte y selectivamente estimulados; (vi) la hidrofobicidad no es una

característica obligatoria para el tercer residuo, y (vii) el requisito de un grupo carboxílico C-terminal, ya sea libre o esterificado, es esencial para desencadenar una respuesta biológica en neutrófilos humanos. Analizando la estructura se vio también que se produce una potencia agonista óptima cuando (a) el grupo N-terminal está formilado, (b) el primer aminoácido es Methionyl, (c) el segundo el aminoácido tiene una cadena lateral hidrófoba voluminosa y (d) el tercer aminoácido que es fenilalanina (Phe) tiene una interacción crítica con el receptor, posiblemente a través de la vinculación con un puente de hidrógeno (Cavicchioni, Fraulini y Cols. 2006).

3.5 LAS CITOQUINAS

La **Interleucina 1**, en una proteína cuyos primeros efectos atribuidos fueron: la inducción de fiebre, aumento de las respuestas de los linfocitos y la estimulación de la respuesta de fase aguda en la inflamación. De ahí los nombres más antiguos como Pirógeno endógeno y factor activador de linfocitos(LAF). Dos diferentes moléculas se conocen con efectos agonistas: IL-1 α y IL-1 β . Mientras que IL-1 α está predominantemente unida a la membrana, IL-1 β se secreta.

La activación de IL-1 β usualmente ocurre como un proceso de dos pasos: primero, la transcripción de ARNm de IL-1 β se induce y traduce como una proteína precursora de IL-1(pro-IL-1 β). Este proceso puede ocurrir después de la activación de receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll (TLR), en el caso de una infección, o después de la liberación de alarmas como la IL-1 α que ocurre después de la muerte celular. El segundo paso es la activación de IL-1 β que se basa en la acción de las enzimas intracelulares (caspasas), que escinden pro-IL-1 β en una molécula de 17 kD biológicamente

activa. La IL-1 β madura se secreta, se une al receptor de IL-1 y ejerce su función biológica. La escisión de pro-IL-1 β puede lograrse mediante dos mecanismos distintos: El primero, que se presenta típicamente en monocitos y macrófagos, es dependiente del *Inflamasoma* (estructura proteica multimolecular que opera en la maduración de IL-1 β e involucra la cisteína proteasa denominada Caspasa-1, una proteína intracelular inicialmente llamada enzima convertidora de IL-1).

El proceso de dos etapas de activación completa de IL-1 β es importante en sitios expuestos a desafíos microbianos, como las superficies internas del cuerpo. En estos sitios, no se libera IL-1 β a menos que se produzca una activación adicional de Inflamasoma. Por ejemplo, la activación del Inflamasoma puede ser activada por el ATP liberado por las células moribundas, que activa el purinoceptor 7 P2X, o por productos de neutrófilos como el péptido antimicrobiano catelicidina (también conocido como LL-37), producido durante las respuestas inflamatorias locales con participación de neutrófilos. Con la sola presencia de microorganismos no se desencadena la producción de IL-1 β en los tejidos de la superficie interna del cuerpo, lo cual evita la producción incontrolada de IL-1 β y la consiguiente inflamación en condiciones fisiológicas.

En el caso de los neutrófilos, estos tienen un papel específico en el desencadenamiento de la respuesta de IL-1 β independientemente de la caspasa-1 y la activación del Inflamasoma, aunque también se han descrito en estas células la existencia de vías para la activación de la IL-1 no dependientes del Inflamasoma. En este contexto, es importante mencionar que otras enzimas, además de la caspasa-1, pueden procesar y activar la IL-1. Este proceso, conocido como la *vía independiente del Inflamasoma*, implica serin-proteasas derivadas de

neutrófilos, en particular la proteinasa-3 (también conocida como mieloblastina), pero también incluye la elastasa de neutrófilos, la catepsina G y la granzima A. Otras enzimas que también activan la IL-1 β incluyen la quimasa, las quimotripsinas y la subunidad-meprina A de las metalo-proteinasas y la subunidad- β 32 de la meprina A. Estas vías independientes del Inflamasoma aseguran una activación robusta de IL-1 β en tejidos inflamados, donde los neutrófilos son abundantes.

IL-1 β es un mediador proinflamatorio altamente potente a nivel tisular que conduce a *la vasodilatación, promueve la atracción de granulocitos al tejido inflamado e induce la expresión de prostaglandinas*. Aparte de estas funciones bien descritas de IL-1 β durante la respuesta inflamatoria aguda, se han descrito efectos adicionales en las células T que sugieren que la IL-1 β podría vincular la inmunidad innata y adaptativa (Schett, Dayer et al. 2015). Sus efectos en el control del centro termorregulador para modular la temperatura corporal y la generación de fiebre, así como sus efectos de activación de la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda (Proteína C reactiva, Proteína A sérica del amiloide, Factor reumatoideo, Haptoglobina, factores del complemento, ceruloplasmina, fibrinógeno, α -1 antitripsina, α -1 glicoproteína ácida), son parte de estos efectos adicionales que contribuyen al estadio de enfermedad que caracterizan a los procesos inflamatorios agudos.

La **Interleucina-6 (IL-6)** es una citoquina esencial que transmite señales de defensa desde un sitio de invasión de patógenos o de daño tisular para estimular la presencia de reaccionantes de fase aguda, la hematopoyesis y la preparación de varios órganos internos para la defensa del huésped. Sin embargo, la producción excesiva y sostenida de IL-6 está

asociada con varias enfermedades inflamatorias. Un nivel de IL-6 sérico saludable es inferior a 4pg/ml, pero este nivel aumenta a varias decenas o incluso a cientos de pg/ml en enfermedades crónicas según la gravedad y la ubicación de la enfermedad. Pueden ocurrir valores de más de 1000 pg/ml durante el shock séptico o en una tormenta de citoquinas; en casos graves, se puede alcanzar un nivel medido en $\mu\text{g/ml}$, en el que una señalización de defensa excesiva puede amenazar la supervivencia del sujeto (Tanaka, Narazaki y Cols. 2016).

En las células diana, la IL-6 se une a un receptor de IL-6 de 80 kDa (IL-6R). El complejo de IL-6 e IL-6R se asocia con una segunda proteína, gp130, que luego se dimeriza e inicia la señalización intracelular. Mientras que gp130 se expresa en todas las células, IL-6R solo está presente en unas pocas células del cuerpo, incluidos los hepatocitos y algunos leucocitos. Las células que no expresan IL-6R no pueden responder a la citosina, ya que la gp130 sola no tiene una afinidad mensurable por IL-6. Curiosamente, una forma soluble de IL-6R (sIL-6R), que comprende la porción extracelular del receptor, puede unirse a IL-6 con una afinidad similar a la del IL-6R unido a membrana. El complejo de IL-6 y sIL-6R puede unirse a gp130 en células que no expresan IL-6R y que no responden a IL-6. Este proceso se ha denominado trans-señalización. La señalización trans de IL-6 es proinflamatoria, mientras que la señalización clásica de IL-6 a través de la IL-6R unida a la membrana es necesaria para las actividades regenerativas o antiinflamatorias de la citoquina.

La expresión de IL-6 está regulada por varios mecanismos que son: el polimorfismo de genes, la remodelación de la cromatina, y los niveles transcripcionales y post-transcripcionales (Tanaka, Narazaki y Cols. 2016).

En las lesiones infectadas, los componentes de las estructuras bacterianas y fúngicas son reconocidas por los TLR de la superficie celular y sus ácidos nucleicos son reconocidos por los TLR intracelulares. La inflamación no infecciosa debida a quemaduras, cuerpos extraños, toxinas, traumatismos e incluso operaciones quirúrgicas estériles produce células dañadas, necróticas y una *matriz extracelular* degradada. Las moléculas derivadas de la lesión tisular y otras como los ácidos grasos libres también son reconocidas por los TLR. La activación de la superficie celular y de los TLR intracelulares en monocitos y macrófagos induce la transcripción de ARNm de IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias, como TNF α e IL-1 β , a través del factor nuclear-kappa β (NF- κ B). La señalización de TNF α o IL-1 β también induce la transcripción del ARNm de interleucina 6 (IL-6). Después de la transcripción, el ARNm de IL-6 se regula a nivel postranscripcional por elementos ricos en adenil-uridilato (ARE) ubicados en la región 3'UTR del ARNm de IL-6. Una nucleasa conocida como RNasa-1 reguladora (Regnasa-1) degrada el ARNm de IL-6 transcripcionalmente activo al unirse a IL-6 3'UTR en el citoplasma, el retículo endoplásmico y los ribosomas. En contraste, la proteína de unión al ARN, proteína 5a que contiene el dominio interactivo rico en AT (Arid5a), se expresa en respuesta a la presencia de lipopolisacárido (LPS), IL-1 β e IL-6 en macrófagos y bajo condiciones de polarización Th17 en células T. El ARNm de IL-6 unido a Arid5a está protegido de la degradación por Regnasa-1 en el citoplasma. Las funciones contrarias de Arid5a y Regnasa-1 con respecto a la estabilidad del ARNm de IL-6 indican que el equilibrio dinámico entre los dos gobierna la producción y la cantidad de IL-6.

También la IL-6 desempeña un papel fundamental en la configuración de la respuesta inmune adquirida al *promover la diferenciación de las células B en células plasmáticas*

productoras de inmunoglobulina y aumentar el nivel de gamma globulina en el suero. La IL-6 también apoya la supervivencia de los plasmablastos que son precursores de las células plasmáticas. En las células T, IL-6 regula la dirección de la diferenciación específica de las células T CD4 vírgenes. La IL-6 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) son requeridos en acción coordinada para la diferenciación de Th17, las cuales producen IL-17, IL-21 e IL-22 y contribuyen a la protección contra infecciones bacterianas o fúngicas. La IL-6 tiene otros efectos vinculados con la enfermedad como la actividad de caquectina mediante la cual induce en los músculos la proteólisis de actina y la miosina para la provisión de aminoácidos en los procesos de defensa activa. (Narazaki and Kishimoto 2018, Murakami, Kamimura y Cols. 2019).

La **Interleucina 8 (IL-8)**, también conocida como CXCL8, *es una quimiocina proinflamatoria* de tipo CXC¹ que se procesa para dar lugar a una proteína funcionalmente competente de 77 aminoácidos, en el caso de la IL-8 producida por células parenquimatosas, y de 72 aminoácidos en el caso de la producida por monocitos y macrófagos. La producción de IL-8 está regulada principalmente por los factores de transcripción NF- $\kappa\beta$ y en menor medida por el Factor Nuclear (NF)-IL6. IL-8 es una quimiocina fundamental para promover la infiltración tisular por los leucocitos polimorfonucleares. Los efectos biológicos de la IL-8 se ejercen a través de dos receptores de superficie llamados CXCR1 y CXCR2 ubicados en

1

Las quimiocinas se dividen en cuatro familias: dos mayores con numerosas proteínas y dos menores con una o dos proteínas cada una. La nomenclatura se estandarizó el año 2000 basado en la secuencia de residuos de cisteína. Una de las familias mayores se caracteriza por la presencia de un aminoácido entre las dos primeras cisteínas, se denomina CXC o alfa. La otra familia mayor presenta las dos primeras cisteínas en forma adyacente y se denomina CC o beta. La proteína de la familia menor CX3C presenta tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas. Por último, la familia menor XC, tiene proteínas con un solo enlace disulfuro¹

dichas células. Estos receptores comparten una notable similitud y homología en su secuencia, lo que sugiere que son el producto de una duplicación de genes. Las señales de estos receptores se transmiten a través de la membrana plasmática mediante cambios conformacionales que exponen regiones en los bucles intracelulares del receptor. Estos cambios conformacionales permiten que las proteínas G se unan (principalmente *G α* , aunque posiblemente también estén involucradas otras proteínas G insensibles a la *toxina pertussis*). La activación de las proteínas G determina la activación de la Fosfoinositol-3-quinasa (PI3Kinasa), la fosfolipasa C y los miembros de la familia de proteínas RAS. Estos eventos a su vez determinan la activación de la vía AKT-(protein cinasa B) diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), la activación de la Protein quinasa C(PKC) y la entrada de calcio iónico en el citosol. La reorganización del citoesqueleto está mediada principalmente por las GTPasas de proteínas Ras homologas (Rho) y la quinasa de adhesión focal (FAK), que reorganiza el citoesqueleto de actina a través del complejo de Proteínas Relacionadas con la Actina (ARP) 2/3. Estas vías de señalización pueden tener efectos en múltiples funciones de leucocitos además de la migración. La quimioatracción de neutrófilos al foco inflamatorio está mediada por diferentes sustancias, entre las que se destacan una familia de quimiocinas (entre las que destaca la IL-8), que actúan sobre los receptores de quimiocinas CXCR1 y CXCR2. Los receptores CXCR1 y CXCR2 no comparten los mismos ligandos. CXCR1 se activa solo en respuesta a CXCL1, CXCL6 y CXCL8, mientras que CXCR2 se activa con varias quimiocinas CXC, además de las mencionadas anteriormente, como: el Oncogén regulado por crecimiento alfa (GRO α), el Oncogén regulado por crecimiento beta (GRO β), el péptido activador de neutrófilos GPC-2, el Péptido

activador de neutrófilos 2 (NAP-2) y el Péptido activador de neutrófilos epiteliales (ENA - 78). La exposición de estos receptores a sus ligandos determina la internalización intracelular y, por lo tanto, la desensibilización de la célula a la quimiocina. Además, las funciones de CXCR1 y CXCR2 no se superponen, ya que la primera además de la quimiotaxis parece jugar un papel importante en la activación de la capacidad microbicida de los leucocitos polimorfonucleares. La consecuencia de su funcionamiento es la acumulación de leucocitos activados en el sitio de infección o foco de inflamación (Baggiolini, Loetscher y Cols. 1995, Gonzalez-Aparicio y Alfaro 2019).

La **Interleucina-10** es una citoquina antiinflamatoria esencial que juega funciones importantes como regulador negativo de las respuestas inmunes a los antígenos microbianos. Tiene un amplio espectro de funciones antiinflamatorias y puede suprimir las respuestas inmunes a antígenos extraños o a antígenos propios. Actúa principalmente sobre las células presentadoras de antígenos, como los monocitos y macrófagos, inhibiendo la liberación de mediadores pro-inflamatorios, incluidos TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), por parte de estas células. La IL-10 también inhibe la presentación de antígenos reduciendo tanto la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) como la co-estimulación de moléculas que facilitan el contacto intracelular (por ejemplo, CD86) y de las moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54). Además, la IL-10 inhibe la producción y/o la secreción de citoquinas necesarias para la diferenciación de las células T CD4 +, como la IL-12 y la IL-23. Es decir que, además estas formas indirectas de inhibir las respuestas de las células T a través de la regulación negativa

de las funciones de las Células presentadoras de antígenos (APC), la IL-10 también puede inhibir directamente la proliferación y la producción de citoquinas de las células T CD4 + (Groux, Bigler y Cols. 1996). La IL-10 puede producirse en respuesta a señales pro-inflamatorias por prácticamente todas las células inmunes, incluyendo células T, células B, macrófagos y células dendríticas. Dada su función en el mantenimiento del delicado equilibrio entre la inmunidad efectiva y la protección de los tejidos, es evidente que la expresión de IL-10 es altamente dinámica y necesita ser estrechamente regulada. IL-10 está formada por homodímeros unidos de forma no covalente, que se unen a dos cadenas receptoras, IL-10R1 e IL-10R2. IL-10R1 se une a IL-10 con alta afinidad y es específico para el receptor de IL-10, mientras que IL-10R2 es un componente común de los receptores para IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B, y IL-29. Mientras que la cadena IL-10R2 se expresa de manera ubicua, IL-10R1 está presente principalmente en los leucocitos. De hecho, IL-10 es el único miembro, que actúa principalmente sobre los leucocitos (Ouyang, Rutz y Cols. 2011, Rutz, Wang y Cols. 2014).

La IL-10 induce señales a través de la vía de señalización Janus kinasa (Jak) /activador de la transcripción (STAT). Jak1 y tirosin-kinasa 2 (Tyk2) están asociados con IL-10R1 e IL-10R2, respectivamente. La unión de IL-10 al receptor conduce a la fosforilación del receptor dependiente de Jak. Esto permite el reclutamiento de STAT3 y en menor medida STAT1. Jak1 y Tyk2 fosforilan STAT3 en la tirosina 705, lo que lleva a su disociación del receptor y la formación de un homodímero activo el cual continúa la ruta de activación de los intermediarios antiinflamatorios (Rutz and Ouyang 2016).

El equilibrio TH1/TH2 es uno de los aspectos más importantes de la acción inmunomoduladora de la IL-10. TH1 y TH2 desempeñan funciones importantes en la inmunidad mediada por células y la inmunidad de las mucosas respectivamente. IL-10 mejora la activación y proliferación de las células B (respuesta TH2), que son importantes en la defensa mucosa frente a las toxinas bacterianas y parásitos intestinales (Mollazadeh, Cicero et al. 2019) y, por el contrario, inhibe la activación de la respuesta TH1 reduciendo la potencia de la respuesta inmune celular, principal mediador de la inflamación.

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α). - Se ha demostrado que ésta es la citoquina pro inflamatoria maestra: modula múltiples vías de señalización con amplios efectos posteriores. El TNF- α desempeña un papel vital en la respuesta inmunitaria típica a través de la regulación de una serie de vías que abarcan una reacción inflamatoria inmediata con una significativa participación de la inmunidad innata, así como la activación celular con la proliferación subsiguiente y la muerte celular programada o la necrosis. Como podría esperarse con un espectro tan amplio de efectos celulares y vías de señalización complejas, el TNF- α también se ha relacionado con varios estados de enfermedad, como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la enfermedad de Crohn. Desde el momento de su descubrimiento hace más de 40 años, el ligando de TNF y sus receptores, el receptor de TNF (TNFR) 1 y 2, se han clasificado en dos superfamilias complementarias, a saber, Superfamilia TNF (TNFSF) y superfamilia de receptores TNFR (TNFRSF), 19 ligandos y 29 de los receptores han sido identificados. El TNF- α se produce principalmente por monocitos/macrófagos, pero varios otros tipos de células, como los linfocitos T y B, los mastocitos, las células asesinas naturales, los neutrófilos, los fibroblastos y los osteoclastos,

también pueden secretar TNF- α , aunque en cantidades más pequeñas(Holbrook, Lara-Reyna y Cols. 2019).

La secreción de TNF- α puede ser inducida por elementos estructurales conservados comunes a los patógenos microbianos, incluidos restos de pared celular, como el peptidoglicano, el lipopolisacárido (LPS) y los motivos bacterianos de ADN CpG, que son capturados por receptores tipo Toll (TLR). Los TLR transcripcionalmente inducen a las citosinas proinflamatorias, incluido el TNF- α , a través de la convergencia de las vías de activación de NF- κ B y NF-AT, y mejoran la eficiencia de la traducción(Locksley, Killeen y Cols. 2001).

Interferones (IFN): Los IFNs se descubrieron originalmente como agentes que interfieren con la replicación viral. Inicialmente, se clasificaron según el tipo de célula secretora, pero ahora se clasifican en tipo I y tipo II según la especificidad del receptor y la homología de secuencia.

Los IFNs de tipo I están compuestos por múltiples subtipos de IFN- α (14-20, dependiendo de la especie), IFN- β , IFN- ω , IFN- κ , IFN- δ e IFN- τ , todos los cuales están relacionados estructuralmente y se unen a un receptor heterodimérico común (IFNAR, compuesto por Cadenas IFNAR1 e IFNAR2). Aunque los IFN de tipo I son secretados a niveles bajos por casi todos los tipos de células, las células hematopoyéticas son los principales productores de IFN- α e IFN- ω , mientras que los fibroblastos son una fuente celular importante de IFN- β . IFN- β también es producido por macrófagos bajo estímulos apropiados. La infección viral es el estímulo clásico para la expresión de IFN- α e IFN- β . IFN- γ es el único tipo II IFN.

Estructuralmente no está relacionado con los IFNs de tipo I, se une a un receptor diferente y está codificado por un locus cromosómico separado. Inicialmente, se creía que los linfocitos de células auxiliares CD4 T tipo 1 (Th1), los linfocitos citotóxicos CD8 y las células NK producían exclusivamente IFN- γ . Sin embargo, ahora hay evidencia de que otras células, tales como las células B, las células NKT (células T con actividad de asesinas naturales) y las células profesionales presentadoras de antígenos (APC), segregan IFN- γ . La producción de IFN- γ por APC profesionales [monocitos/macrófagos, células dendríticas (CD)] que actúan localmente puede ser importante en la autoactivación celular y la activación de células cercanas. La secreción de IFN- γ por las células NK y las APC profesionales es importante en la defensa temprana del huésped contra la infección, mientras que los linfocitos T se convierten en la principal fuente de IFN- γ en la respuesta inmunitaria adaptativa (Gessani and Belardelli 1998, Frucht, Fukao y Cols. 2001, Sen 2001).

La producción de IFN- γ está controlada por citoquinas secretadas por APC, especialmente interleucina (IL)-12 e IL-18. Estas citoquinas sirven como un puente para vincular la infección con la producción de IFN- γ en la respuesta inmune innata. En macrófagos, células NK y T, la combinación de la estimulación de IL-12 e IL-18 aumenta aún más la producción de IFN- γ . Los reguladores negativos de la producción de IFN- γ incluyen IL-4, IL-10, factor de crecimiento transformante β y glucocorticoides. La estimulación de IFN- γ induce una sustitución de lo constitutivo de las Subunidades proteasoma con subunidades "inmunoproteasoma", esto sirve para aumentar los niveles y la diversidad de los epítomos presentados para el reconocimiento de células T CD8 en el contexto de MHC de clase I y, por lo tanto, para aumentar la vigilancia inmunológica. IFN- γ , además, es capaz de inducir

la expresión de MHC de clase II en células que no expresan de forma constitutiva estos genes (APC no profesionales)(Munder, Mallo y Cols. 1998, Dinarello 1999, Akira 2000, Schindler, Lutz y Cols. 2001)

El IFN- γ es un producto importante de las células Th1 y además sesga la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1. IFN- γ logra esto mediante la promoción de mecanismos característicos de los efectos de Th1: inmunidad mediada por células innatas (a través de la activación de las funciones de los efectos de las células NK), inmunidad citotóxica específica (a través de las células T en interacciones con APC) y activación de macrófagos. La inmunidad citotóxica específica inducida por el IFN- γ se promueve mediante mecanismos directos e indirectos. IFN- γ promueve la inmunidad citotóxica específica por mecanismos indirectos, como la inhibición del crecimiento de poblaciones Th2 y la regulación positiva del procesamiento de antígenos, de la presentación y de la expresión de moléculas co-estimuladoras de APC, aumentando así la diferenciación de CD4+. IFN- γ también influye de manera más directa en la diferenciación de células CD4+ naive hacia un fenotipo Th1. El fenotipo adoptado por una célula T naive durante la activación de la célula T está fuertemente influenciado por citoquinas presentes en el medio en el momento del compromiso del receptor de la célula T con el antígeno. IFN- γ e IL-12 son las citoquinas prototípicas que dirigen la diferenciación a Th1 durante la respuesta primaria al antígeno, en cambio IL-4 dirige la diferenciación de las poblaciones a Th2. IFN- γ induce la producción de IL-12 en los fagocitos, e inhibe la secreción de IL-4 por las poblaciones de Th2, lo que puede impulsar aún más la diferenciación de Th1 *in vivo*(Gajewski and Fitch 1988, Yoshida, Koide y Cols. 1994).

IL-12 e IFN- γ coordinan el vínculo entre el reconocimiento de patógenos, por las células inmunes innatas, y la inducción de inmunidad específica, al mediar un circuito de retroalimentación positiva para amplificar la respuesta Th1. El LPS y otros patrones moleculares asociados a patógenos desencadenan directamente la producción de IL-12 tras el reconocimiento por macrófagos, CD y neutrófilos, que a su vez inducen la secreción de IFN- γ en células T CD4+ y células NK estimuladas con antígeno. IL-18 es altamente sinérgica con IL-12 para la producción de IFN y tiene funciones importantes en la respuesta Th in vivo. La secreción de grandes cantidades de IFN- γ o IL-4 conduce a la definición característica de las células Th1 o Th2, respectivamente. Estas citoquinas funcionan para promover directamente la inmunidad mediada por células (IFN- γ) o la inmunidad humoral (IL-4) y para antagonizar recíprocamente las acciones de las demás, polarizando aún más la respuesta. Por ejemplo, IL-4 inhibe la activación dependiente de IFN- γ de las funciones del efector de macrófagos. A la inversa, IFN- γ antagoniza la inducción dependiente de IL-4 del receptor de IgE, Fc ϵ RII (Kubin, Chow y Cols. 1994, Boehm, Klamp y Cols. 1997, Dinarello 1999, Akira 2000).

Otro de los efectos más importantes de IFN- γ en los macrófagos es la activación de funciones efectoras microbicidas. Los macrófagos activados por IFN- γ , muestran un aumento de la pinocitosis y la fagocitosis mediada por receptores, así como una capacidad mejorada de destrucción microbiana. La capacidad microbicida activada por IFN- γ incluye la inducción del sistema oxidasa dependiente de NADPH de los fagocitos (NADPH oxidasa "estallido respiratorio"), agotamiento del triptófano y regulación positiva de la producción y activación de enzimas lisosomales que promueven la destrucción de los microbios.

Similares mecanismos microbicidas son activados por IFN- γ en los neutrófilos(Boehm, Klamp y Cols. 1997).

La capacidad de IFN- γ para coordinar la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa la distingue de los otros IFNs. Los mecanismos por los cuales IFN- γ coordina esta transición incluyen: ayuda en el desarrollo de una respuesta tipo Th1, promoviendo directamente el cambio de isotipo de células B a IgG2a, y la regulación de las interacciones leucocito-células endoteliales locales (Snapper and Paul 1987, Huang, Hendriks y Cols. 1993). El IFN- γ organiza el tráfico de células inmunes específicas para sitios de inflamación a través de la promoción de la expresión de las moléculas de adhesión de las quimiocinas. IFN- γ y el Óxido Nítrico producido en el sitio de la inflamación causa dilatación local de los vasos sanguíneos, modificando así el caudal y acumulación de sangre en vasos. El medio de citoquinas/quimiocinas instruye a los subconjuntos específicos de leucocitos para extravasar el tejido a través de las interacciones entre las moléculas de adhesión presentes en los leucocitos y las superficies endoteliales ("diapédesis"). El IFN- γ regula este proceso mediante la regulación de la expresión de quimiocinas [P. Ej., Proteína 10 inducida por Interferón gamma (IP-10), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), Monocina inducida por interferón gamma (MIG), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1), quimiocina expresada y secretada por linfocitos T normales regulada por activación (RANTES)] y moléculas de adhesión [p. Ej., la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1)]. TNF- α e IL-1 regulan sinérgicamente muchas de estas moléculas(Schroder, Hertzog y Cols. 2004).

3.6 INFLAMASOMA

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) presentes en los microbios invasores y los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP) resultantes de las agresiones celulares son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). Este proceso de reconocimiento da como resultado la activación de un complejo proteico supramolecular citosólico conocido como Inflamasoma que actúa como una plataforma de señalización e inicia una respuesta inflamatoria al desencadenar la producción de citosinas proinflamatorias [interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18)].

El Inflamasoma es una plataforma de señalización filamentososa de tres componentes (sensor, adaptador y efector) que protege de múltiples infecciones patogénicas al estimular la maduración proteolítica de las citosinas proinflamatorias y la muerte celular piroptótica.

Las proteínas sensoras se dividen en **dos clases**: las denominadas Ausentes en los receptores tipo melanoma 2 (AIM2) y los receptores tipo NOD (Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos) (NLR por sus iniciales en inglés). AIM2 e IFI16 (proteína inducible por interferón gamma) pertenecen a la familia NLR y comprenden un Dominio de Pirina (PYD) N-terminal que interactúa con la proteína adaptadora ASC (proteína asociada a la apoptosis) y un dominio HIN (localización nuclear, hematopoyético, inducible por interferón) C-terminal para el reconocimiento de doble cadena de ADN (dsDNA). Los NLR tienen una organización de dominio tripartita y consisten en: (1) CARD N-terminal o inhibidor de baculovirus de la repetición de la proteína de apoptosis (BIR) o PYD, que media en las interacciones proteína-proteína homotípicas para la señalización posterior; (2) dominio central de unión a nucleótidos (NBD) o dominio NACHT [NAIP (neuronal apoptosis

inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) que provoca la oligomerización inducida por ATP; y (3) serie múltiple C-terminal de repeticiones ricas en leucina (LRR), que son responsables de la detección de ligandos y la autorregulación. El dominio NBD pertenece a las tres subfamilias que incluyen: NOD/NLRC [(proteína que contiene el dominio CARD de la familia NLR) NOD1–5], NLRP/NALP [(proteína receptora tipo NOD) NLRP1–14] e IPAF [(proteína que contiene el dominio CARD de la familia NLR) factor activador de proteasa (NLRC4 y NAIP)]. El genoma humano codifica 23 NLR; sin embargo, solo unas pocas proteínas NLR, como NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP9, NLRP12 y NLRC4, forman inflamasomas y activan la caspasa-1. Estos NLR comparten dominios NACHT estructuralmente similares, pero su activación es iniciada por diferentes estímulos.

Las proteínas sensoras como NLRP3 y AIM2, requieren la proteína adaptadora ASC para el ensamblaje y la activación del Inflamasoma y, por lo tanto, se conocen como inflamasomas dependientes de ASC. Otras interacciones homotípicas de ASC^{CARD} con caspasa-1^{CARD} dan como resultado la liberación de IL-1 β e IL-18. Estos eventos facilitan las vías de señalización de NF- κ B (potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas), JNK (quinasa N-terminal de Jun) y p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) que conducen a una alta expresión niveles de citocinas y quimiocinas, y el reclutamiento concomitante de células inmunitarias en el sitio de invasión de patógenos o daño tisular. Otros sensores con CARD (p. ej., NLRC4/NAIP y NLRP1) pueden activar directamente la caspasa-1 y, por lo tanto, son representantes de los inflamasomas

independientes de ASC. Sin embargo, los estudios informados sobre la función de este último muestran que la presencia de ASC aumenta la secreción de IL-1 β (Faustin,2007)

Los inflamasomas no canónicos no son partículas de inflamasomas *per se*. En cambio, la oligomerización y la autoactivación de la Caspasa están mediadas por la unión directa del dominio CARD de la caspasa-11 con componentes de la pared celular de bacterias como el lípido A intracelular y el lipopolisacárido (LPS). Esta unión induce la oligomerización y la activación de la Caspasa, con la subsiguiente escisión de la gasdermina D (GSDMD) y la muerte celular por piroptosis.

La desregulación de la activación del Inflamasoma es responsable de varias enfermedades autoinflamatorias que están asociadas con altos niveles de secreción de IL-1 β y/o IL-18. Actualmente, se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de la activación, ensamblaje y regulación de los inflamasomas. Sin embargo, el estudio de las bases moleculares responsables del ensamblaje del Inflamasoma y su disolución es todavía un campo emergente. Los estudios estructurales y biofísicos completos ayudarán en la identificación de los factores que influyen en la formación y el desmontaje del Inflamasoma, así como en el descubrimiento de dianas terapéuticas destinadas a diseñar nuevos fármacos antiinflamatorios (Sharma, M. 2021).

El Inflamasoma NLRP3 (también denominado criopirina o NALP3, dominios NOD, LRR y pirina que contiene Proteína 3) ha sido hasta ahora el miembro mejor estudiado de esta amplia familia. Se requieren dos señales para la activación completa del NLRP3, incluyendo, en primer lugar, una activación del NF- κ B dependiente del TLR, que da lugar a la regulación de la expresión del NLRP3 y del pro-IL-1 β ("cebado") y, en segundo lugar, una señal de

activación del NLRP3, que comprende múltiples moléculas extrañas y endógenas. El gran número de activadores conocidos de NLRP3 hace que sea muy poco probable que NLRP3 perciba directamente todos estos diferentes desencadenantes. En cambio, ahora se reconoce generalmente que la activación de NLRP3 se produce principalmente como consecuencia de una forma común de estrés celular provocado por los diferentes estímulos. Actualmente se consideran tres mecanismos principales para dicha activación. El primero, denominado modelo de canal, está relacionado con el flujo de K⁺ desde la célula (que puede también ser inducido por virus). El segundo, denominado modelo de ruptura del lisosoma, depende de la desestabilización y la ruptura del compartimento del fagolisosoma, especialmente tras la digestión de material particulado, y que da lugar a la liberación de la proteína lisosomal catepsina B como activador de NLRP3. El tercer modelo, denominado modelo de especies reactivas de oxígeno (ROS), implica la formación de ROS, la desregulación del estado redox celular y el estrés mitocondrial como mecanismos clave en el proceso de activación de NLRP3. Dos argumentos principales apoyan este modelo. En primer lugar, cabe destacar que todos los activadores de NLRP3 son capaces de inducir la generación intracelular de ROS, y en segundo lugar, el tratamiento con diversos eliminadores de ROS puede bloquear la activación de NLRP3 por múltiples agonistas (Lugrin, Rosenblatt-Velin, Parapanov, & Liaudet, 2014).

Otro modelo propuesto que desencadena el ensamblaje del NLRP3 es la reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Se ha demostrado que los inductores del NLRP3, como el ATP y la nigericina, causan daño mitocondrial. Además, el daño inducido por el ATP

y las ROS en las mitocondrias provoca reducciones en los niveles citoplasmáticos de NAD⁺(Gurung, Lukens, & Kanneganti, 2015).

La proteína ausente en el melanoma 2 (AIM2) es un receptor intracelular de reconocimiento de patrones y al detectar el ADN citosólico bacteriano y viral se oligomeriza con la proteína adaptadora ASC para formar el inflamasoma-AIM2, que activa la caspasa-1 y provoca la secreción de IL-1 β . La desregulación del inflamasoma-AIM2 da lugar a enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes como la psoriasis y el lupus eritematoso sistémico. El AIM2 también está implicado en el aneurisma de la aorta abdominal y en la glomerulonefritis asociada al virus de la hepatitis B (Kaneko y Cols, 2015).

Es el primer miembro de la familia no-NLR, y la oligomerización dentro del Inflamasoma se produce por la unión del dominio HIN C-terminal. Como en el caso de otros inflamasomas, al autoactivarse, la caspasa-1 dirige la maduración y secreción de citoquinas proinflamatorias (como la IL-1 β y la IL-18). Los requisitos de ligando para AIM2 son bastante permisivos, ya que el dsDNA citosólico de virus, bacterias o el propio huésped pueden activar el inflamasoma-AIM2 (Schroder & Tschopp, 2010).

La pro-IL-1 β está ausente en las células en reposo, la activación del Inflamasoma representa el segundo paso en la generación de la IL-1 β bioactiva escindida. El primer paso es la regulación de la expresión del gen de la IL-1 β , un proceso que en este contexto se denomina cebado. Dependiendo del tipo de célula, el cebado también puede aumentar la expresión de NLRP3 y potencialmente de otros factores implicados en la activación del Inflamasoma. Esto ocurre, por ejemplo, en respuesta a la activación de los receptores de reconocimiento

de patrones (PRR) unidos a la membrana y conlleva la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B (O. Gross, 2012).

La caspasa-1 activa procesa las citoquinas proinflamatorias proIL-1 β y pro-IL-18, que se secretan de forma no convencional al escindirse la caspasa-1. El procesamiento y la secreción de pro-IL-1 β y pro-IL-18 mediada por el Inflamasoma permite una respuesta proinflamatoria rápida, pero estrechamente regulada y altamente inducible. Además de la secreción de citoquinas, la activación del Inflamasoma también puede desencadenar una muerte celular inflamatoria denominada piroptosis, que sirve para frenar la replicación intracelular de patógenos (de Zoete, Palm, Zhu, & Flavell, 2014).

La piroptosis es un modo de muerte celular no homeostático y lítico que requiere la actividad enzimática de la caspasa-1. Las células que mueren por piroptosis presentan hinchazón citoplasmática y ruptura de la membrana plasmática, características que comparten con la muerte celular necrótica independiente de las caspasas (Lamkanfi & Dixit, 2014).

Dado que un acontecimiento clave en la piroptosis es la pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática, se ha adoptado el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) como uno de los principales enfoques para caracterizar la muerte celular por piroptosis. La LDH es una enzima citosólica liberada por las células dañadas y su presencia en los sobrenadantes de cultivo se detecta por la conversión de lactato en piruvato con la reducción paralela de NAD a NADH (Lage, Amarante-Mendes, & Bortoluci, 2013).

En la mayoría de los estudios sobre el inflamasoma, se utiliza el lipopolisacárido (LPS) para elevar los niveles de pro-IL-1 β antes de la estimulación del inflamasoma; no obstante, en lugar del LPS puede utilizarse una amplia gama de estímulos activadores del factor B nuclear (NF-B), como el factor de necrosis tumoral (TNF), el CpG o la propia IL-1. Dado que la principal lectura de la activación del inflamasoma es la secreción de la forma bioactiva escindida de la IL-1 β , los investigadores que trabajan en el campo del inflamasoma suelen "cebar" sus células con LPS antes de realizar la estimulación real del inflamasoma con activadores. Mientras que in vitro está claro que una señal inflamatoria como el LPS es necesaria para inducir la síntesis de proIL-1 β , el requisito de un agente de cebado distinto para inducir proIL-1 β in vivo es un hecho cuestionable. La activación del inflamasoma, que se ve fuertemente favorecida por el propio paso de cebado a través de la regulación al alza de NLRP3, conduce al procesamiento y secreción de IL-1 β madura (Olaf Gross, Thomas Christina, Guarda, & Tschopp, 2011).

Una vía de activación propuesta para Inflamasoma NLRP3 es la vía común de ROS. La fuente de ROS actualmente no está clara, pero anteriormente se sugirió la participación de una o varias de las siete oxidasas NADPH conocidas. Sin embargo, los macrófagos deficientes en subunidades específicas de tres de las siete NADPH oxidasas, es decir, NOX1, NOX2 y NOX4, responden normalmente a activadores del Inflamasoma o incluso tienen una actividad ligeramente mayor lo que sugiere un posible papel de otros miembros de la NADPH oxidasa o una redundancia funcional (Lugrin, Rosenblatt-Velin, Parapanov, & Liaudet, 2014).

Todo lo anterior muestra la existencia de una compleja red de interacciones celulares/moleculares entre ambos tipos de inmunidad, que asegura la eficacia reguladora de la

respuesta inmune. En este orden, la posibilidad de manipular este proceso con productos ajenos a esta red se ha convertido en un propósito largamente ambicionado por la fármaco inmuno-terapeutica.

En este orden se conoce, que para mantener un organismo saludable es importante mantener un sistema inmunitario en un correcto funcionamiento, para esto se cuentan con algunos recursos farmacológicos los cuales, además de promover o inhibir la respuesta, también pueden producir efectos adversos no deseados. En este sentido es que se están estudiando moléculas que sean capaces de estimular o de inhibir ciertas funciones del sistema inmune conociéndose esto con el término de *inmunomodulación*. Sin embargo, es imprescindible excluir la posibilidad de que a las dosis en las que hay efecto farmacológico existan tales efectos adversos, por lo que en este estudio se inicia explorando la actividad de los extractos sobre la funcionalidad de las células con las que desde el principio se ponen en contacto los compuestos extraños a su entrada al torrente sanguíneo.

La inmunomodulación, específicamente, de la inmunidad innata como primer sistema de respuesta del organismo después las barreras físicas, se puede dar en distintos momentos de cada uno de sus niveles y componentes, tanto en el nivel de las células principales que la componen, como de las moléculas efectoras generadas en las respuestas. Es así que encontramos estudios en los que la modulación de la inmunidad innata resulta de gran ayuda en el control de las enfermedades a través de la generación de estrategias para reforzar el sistema o para controlarlo. Los últimos avances también contemplan el entrenamiento de la inmunidad innata con una modulación a través de la reprogramación epigenética; esto conduce a programas transcripcionales que reconfiguran la señalización

intracelular inmune de las células de la inmunidad innata, y también inducen un cambio en el metabolismo celular de la fosforilación oxidativa hacia la glucólisis aeróbica, aumentando así la capacidad de las células para responder a la estimulación (Netea, Joosten y Cols. 2016).

A través de la inmunomodulación de la respuesta innata o no específica se pueden generar importantes herramientas de gran importancia para determinar el momento óptimo para obtener el resultado deseado. En muchos casos una intervención temprana para la prevención puede llevar a tener resultados positivos para la salud. Es importante destacar que las principales consecuencias de la inmunomodulación pueden ser: a) el que no se tenga ningún efecto, b) que se tenga una inmunosupresión que puede generar una mayor susceptibilidad a las enfermedades, pero que puede regular daño tisular generado por inflamación particularmente la de origen autoinmune o c) se puede suscitar una inmunopotenciación o inmunoestimulación que puede contribuir a eliminar agentes infecciosos como virus o parásitos intracelulares pero también generar enfermedades autoinmunes o de hipersensibilidad (Tsitoura y Tassios 2006).

El estudio de productos naturales con fines terapéuticos va creciendo en nuestro medio, mediante la búsqueda de principios activos que cuenten con márgenes de seguridad para su uso clínico, además de poder establecer un correcto uso de tales productos. En Bolivia cada vez se va estudiando más las plantas, debido a la gran riqueza vegetal que se tiene en el país y el múltiple uso por las distintas etnias, además de poder revalorizar la medicina tradicional en el uso de las plantas con fines terapéuticos.

El poder conocer la capacidad de inmunomodulación por productos naturales para mejores terapias se inició en nuestro laboratorio partiendo de plantas de uso muy común como es el caso *Musa paradisiaca* (plátano) en células del sistema inmune (Terrazas K. 1998) , otros estudios referidos a la inmunomodulación son los de la manzanilla y la *Echinacea* (Ríos, Otero y Cols. 2008).

En este estudio, se pretende conocer el potencial inmunomodulador de plantas amazónicas, seleccionadas por su uso en la etnomedicina a través de sus efectos en células del sistema inmune innato. En este orden, como se mencionó antes, se plantea evaluar los efectos citotóxicos y funcionales de plantas usadas tradicionalmente en la medicina herbolaria sobre las células sanguíneas que ejercen actividades propias de la inmunidad innata. El conocimiento que se genere cobra una importancia relevante en el propósito de obtener los beneficios de los productos naturales con efecto inmunomodulador, los mismos que, además de brindar la posibilidad de contar con terapias seguras, por tener como referencia el uso de estas plantas con diferentes actividades terapéuticas por las poblaciones étnicas de nuestro país, también aporten la posibilidad de que las mismas se vean favorecidas con los resultados de que se persiguen en este trabajo en el campo farmacoterapéutico oficial.

Para nuestro estudio se recolectaron y seleccionaron tres plantas muy conocidas en sus distintos usos por la Etnias de la Amazonia Boliviana las cuales son: *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), *Croton lechlery* Müll.Arg (sangre de Grado) y *Erytroxylum coca lam* (coca). Los aspectos teóricos de las mismas se describen a continuación.

3.7 Equisetum giganteum L.-

También conocida como “cola de caballo gigante” (inglés), “cavalinha” (portugués), es una planta nativa de América del Sur y Central que pertenece a la familia Equisetaceae. (Wright, Van-Buren et al. 2007). Entre los otros nombres con la que se la conoce están: Castellano: Barba león, bigote de tigre, cola de caballo, colaicaballo; Quechua: Mulla Mokko; Guaraní Isosog: Mburikaruguai; Guaraní: Kavayuruguai; Guaraní Urbano: Kavayo ruguai; Tacana: Iba queda.

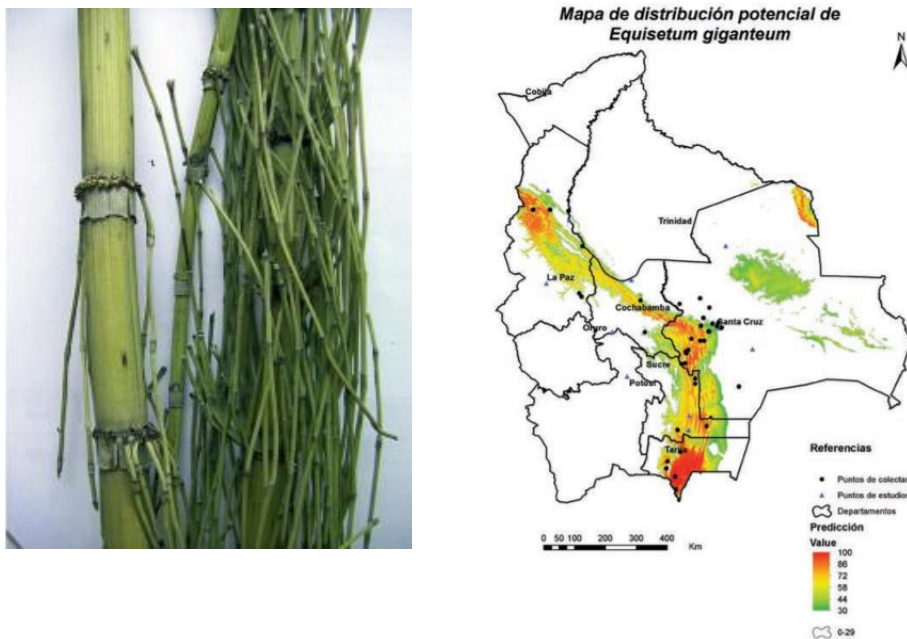


Figura 2. *Equisetum giganteum* material vegetal y Mapa de Distribución potencial en Bolivia

Fuente: Ministerio de Medio ambiente y Agua 2016. Revista Plantas de Bolivia con potencial medicinal: Información biológica y bioquímica Primera parte.

Esta planta tiene una longitud de hasta 2 metros y dentro de sus características se observa que presenta rizomas alargados, además un tallo hueco, erecto, monopodial, con numerosas ramas que parten de los nudos de los verticilos y hojas también verticiladas

reducidas a peciolos soldados que forman una vaina membranácea. Esta especie crece en los Valles, Yungas y Chapare, Chiquitania y Pantanal, Chaco, Amazonia, siendo su hábitat: 0-3000 m.s.m. en Bosque semideciduo chiquitano, Yungas, bosque tucumano-boliviano, bosque serrano chaqueño y en los valles secos. Dentro de sus usos reportados en la medicina tradicional boliviana por diferentes etnias destacan:

Enfermedades del corazón y de la sangre, diabetes, desnutrición, cefaleas, trastornos digestivos, procesos febriles, patologías óseas, trastornos respiratorios, problemas psicológicos (“susto”), trastornos del aparato genito-urinario. Las etnias que reportan estos usos son: Guarani-Isoceño, Quechua, Guaraní urbano, Tacana, Trinitario, Yurakare, Aymara, Tsimane-Moseten. (Ministerio de Salud 2016)

Entre los estudios farmacológicos y fitoquímicos reportados, destaca el estudio llevado a cabo por Francescato, Debenedetti y Cols en 2013 en el que se determinó, dentro de sus principales y más abundantes constituyentes los compuestos fenólicos, y los flavonoides (que son derivados glucosilados del kaempferol cuya actividad es ampliamente conocida). Estudios in vivo desarrollados por Farinon, Lora y Cols. (2013) evalúan el efecto del extracto acuoso de *Equisetum giganteum* (AEGH) como terapia inmunomoduladora, en artritis inducida por antígeno (AIA) en ratones, con albúmina sérica bovina metilada (mBSA); se encontró que en la inflamación se redujo la nocicepción a las 3, 6 y 24 h, disminuyó la migración de leucocitos e inhibió la proliferación de linfocitos estimulados con Concanavalina A y Lipopolisacárido. Jabeur, Martins y Cols. (2017) encontraron que los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides tienen un papel determinante en el potencial antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral de los extractos de *Equisetum*

giganteum L. Se encontró en su composición taninos, proantocianidinas y derivados hidroxycinámicos con diferencias cuali-cuantitativas en su contenido en las distintas partes de la planta, lo cual le genera una mayor capacidad antioxidante de acuerdo con este contenido (Ricco 2011). También se pudo evidenciar que el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Equisetum giganteum* L. tiene actividad contra *C. albicans* en la formación de biofilms en las superficies, por la presencia de flavonoides en su composición, y un efecto antiinflamatorio en monocitos humanos activados por *C. albicans* (Alvarce, Saldanha y Cols. 2015). En el estudio elaborado por Churqui, Lind y Cols. (2018) se pudo evidenciar un efecto antiviral contra Herpes simple tipo 2 del extracto hidroalcohólico de *E. giganteum* L., estudio en el que además se analizó su composición que mostró gran cantidad de compuestos fenólicos presentes que son los que generarían las distintas actividades. Sin embargo, dentro de los estudios realizados aún no se tienen documentados los efectos de esta planta en estudios in vitro específicamente sobre su efecto en las células del sistema inmune que tienen el rol más importante en el proceso inflamatorio y en la actividad antimicrobiana, reportada por otros estudios.

3.8 Croton lechlerii Müll.Arg. -



Figura 3. *Croton lechlerii* corteza y planta

Se describe como un árbol de tamaño mediano que se encuentra en bosques y áreas perturbadas desde el nivel del mar hasta 1000 metros en la Amazonía de Bolivia, Perú, Colombia, y Ecuador. La corteza, cuando se corta, libera un látex rojizo o amarillento llamado “sangre de dragón” o “sangre de grado”. En la Amazonia, la medicina local utiliza la savia ingiriéndola diluida en agua caliente para acelerar la curación interna después de un aborto; también se utiliza como ducha vaginal después del parto (Williams 2001, Jones 2003).

Las propiedades de esta planta incluyen efectos antiinflamatorios (Pieters, de Bruyne y Cols. 1993), antivirales (Ubillas, Jolad y Cols. 1994) y antitumorales (Chen, Cai y Cols. 1994, Jones 2003), que respalda su uso tradicional en muchas partes de la Amazonía, incluyendo Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Varios compuestos han sido aislados previamente de la Sangre de Drago; la composición química incluye un número considerable de fenoles simples, diterpenos, proantocianidinas, fitosteroles, un di-hidrobenzofurano, lignano, y el alcaloide taspina. En un estudio elaborado por Risco, Ghia y Cols. (2003) se evaluó a través de ensayos in vitro la actividad inmunomodulatoria del látex, encontrándose que podía estimular e inhibir la fagocitosis en función de la dosis y una capacidad antioxidante para atrapar radicales libres y pro-oxidante también en función de las dosis. Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria in vivo mediante una prueba de edema de pata de rata inducida por carragenina viéndose que el látex tiene una importante actividad antiinflamatoria cuando se administra i.p. El alcaloide taspina ha sido considerado como el principio activo responsable de la mayor parte de las actividades, a excepción de las propiedades antiinflamatorias donde también deben participar otros componentes, probablemente las

pro-antocianidinas. En el estudio elaborado por Desmarchelier, Schaus y Cols. (1997) se exploró la capacidad antioxidante de Sangre de Grado a través de quimioluminiscencia y se vio que fue altamente eficaz en la reducción de la oxidación del ADN a concentraciones más altas, pero mostró un capacidad pro-oxidante a dosis más bajas, en comparación con el control. En el estudio elaborado por De Marino, Gala y Cols. (2008) se aislaron varios compuestos del látex y se evaluó la actividad antioxidante in vitro mediante el ensayo con 2,2-difenil-1-picrylhidrazilo (DPPH) para valorar la capacidad antioxidante total y se realizaron ensayos de peroxidación lipídica. Se observó que los derivados de flavan-3-ols (como compuestos fenólicos principales en el látex) exhibieron la mayor actividad antioxidante. Por otro lado, efectos genotóxicos y antigenotóxicos fueron encontrados en nuestro laboratorio en la savia de *Croton draconoides* (Tirado, Carvajal y Romero, 2000)

3.9 La Hoja de Coca (Erythroxylum coca). -



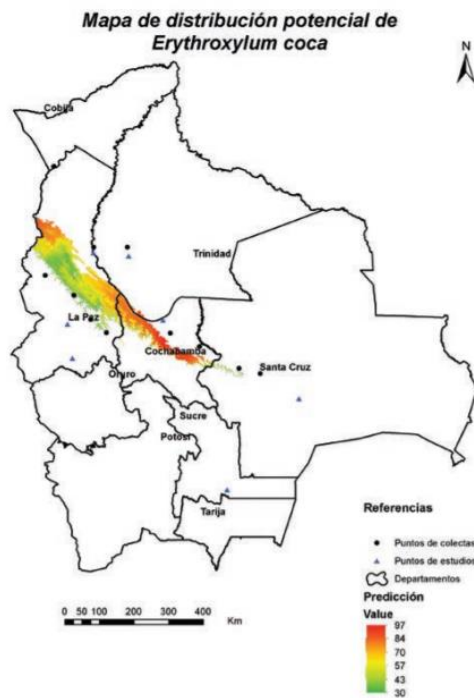


Figura 4. Erythroxylum coca planta y mapa de distribución

Fuente: Ministerio de Medio ambiente y Agua 2016. En: Plantas de Bolivia con potencial medicinal: Información biológica y bioquímica Primera parte

Otros nombres nativos con los que se conoce la planta son: En castellano: Coca; Trinitario:

Koka; Tsimané': Sa'si; Tsimane-mostene: Sa'si/ Cocaj; Yurakare: Kuja; Aymara: Inal/mama

La planta es un arbusto de 80-200 cm, de hojas opuestas, enteras, lanceoladas, y con flores pequeñas y blancas, fruto pequeño, oblongo u ovoide, brillante, color rojo anaranjado.

Crece en la Amazonia subandina particularmente en Yungas y Chapare. Su hábitat es de 0-2000 m.s.m en Bosque húmedo (Yungas).

Dentro de los usos reportados en la medicina tradicional están: el manejo de la Cefalea, dolor de Estómago y de huesos, trastornos de la piel y respiratorios, manejo de la fiebre y patologías del aparato urinario-reproductivo. Las etnias que reportan estos usos son:

Guarani-Isoceño, Quechua, Guaraní urbano, Tacana, Tsimane, Trinitario, Yurakare, Aymara, Tsimane-Moseten (Ministerio de Salud 2016)

La hoja de coca es conocida desde tiempos remotos por sus múltiples usos desde la época de los Incas, hasta tiempos actuales (Stolberg 2011). Muchas personas reportan el beneficio extenso en el mal de altura así como los beneficios en la fatiga laboral, quitando la sed y el hambre (Biondich y Joslin 2015). La mayor parte de los textos de farmacología y terapéutica se refieren al uso de los alcaloides, particularmente la cocaína y destacan los efectos de sus derivados en el campo de la anestesiología y la psiquiatría. La medicina oficial, en cambio, no reporta efectos farmacológicos por parte de las hojas de coca; tal como se acostumbra en las ciencias médicas, solo se reportan efectos farmacológicamente aceptados cuando se trata de moléculas o principios activos identificados. En este marco, los efectos farmacológicos reportados oficialmente solo versan fundamentalmente sobre la cocaína y algunos otros alcaloides derivados. Ya en 1970, Hanna JM publicó una serie de estudios que intentaron determinar la influencia de la masticación de coca en la función cardiovascular y respiratoria durante el desempeño laboral. El primer estudio comparó consumidores habituales de coca con no consumidores durante distintos periodos de trabajo submáximo, en el cual se concluyó que no existía una diferencia grande entre grupos control y experimentales sometidos a un periodo de esfuerzo máximo y que solo podía atribuirse a una percepción de menor fatiga.

En otro estudio Oyola (1993) reporto menor consumo de oxígeno en las mitocondrias del corazón en comparación con el hígado, lo que sugiere un incremento de la ruta anaerobia en este músculo, en sujetos que consumían mate de coca, este hecho, según esta autora,

podría asociarse a la resistencia incrementada a los esfuerzos en la altura. Sin embargo, lo anterior no correlaciona con los hallazgos de Cabrera y Sauvain (1997), sobre la posibilidad de que la coca tenga un efecto estimulador de los centros respiratorios en su respuesta a estímulos de hipoxia e hiperoxia, ya que se evidenció que en el grupo de consumidores -antes del coqueo- se observaban variaciones más importantes que en los no consumidores. Es decir que los consumidores tradicionales de hojas de coca disminuyeron o aumentaron su ventilación en forma más evidente que los no consumidores, después de haber inhalado respectivamente, tres ciclos respiratorios de una mezcla hiperóxica ($O_2=97\%$) o hipóxica ($O_2=10\%$) y posteriormente cuando se efectuó las pruebas de sensibilidad respiratoria a los 60 minutos de que los consumidores concluyeron el coqueo, el efecto agudo del consumo de coca se manifestó con respuestas ventilatorias significativamente mayores tanto al estímulo hiperoxia como hipoxia, y se asume que este efecto tiene una relación directa con la actividad de las catecolaminas, sobre las que existe una conocida acción de los alcaloides que contienen las hojas de coca. En la misma línea, Galarza (1997) reporta que la coca difiere o retrasa el ingreso de los acullicadores en hipoglicemia. Esta posibilidad fue demostrada también con estudios bioquímicos por Casikar, Mujica y Cols.(2010) quienes concluyen que la hiperglucemia inducida en el ejercicio en masticadores de hoja de coca se da por bloqueo de consumo de la glucosa en la vía de la glucosa oxidasa, y se compensa por el consumo de triglicéridos en rutas alternativas de generación de energía.

Por otro lado Gonzales-Carazas, y Melgarejo-García y Cols. (2013) midieron la influencia de un extracto etanolico de *E. coca* sobre la anemia ferropénica en ratas Holtzman macho,

pudiendo evidenciar el aumento de hemoglobina hasta alcanzar valores normales, aunque las dosis no eran comparables a las de consumo humano (18g/d) .

La medicina tradicional reporta su uso en dolencias caracterizadas por inflamación crónica como artritis y gastritis, demencia senil y otros. (Rojas Karla 2013)

Es por esto que, en base a los resultados, que difieren muchos unos de otros, se ve la necesidad de seguir explorando sus efectos, siendo un nivel muy importante el de los estudios in vitro para conocer su actividad sobre los distintos tipos de células y mediadores de la inmunidad.

4. JUSTIFICACION

Los estudios cuya finalidad es evaluar la actividad biológica de productos naturales conforman un campo promisorio debido al amplio y múltiple uso ejercido por la medicina tradicional desde los tiempos ancestrales hasta los tiempos actuales, para distintos tipos de enfermedades. Muchos de los pobladores de diferentes etnias prefieren usar las plantas medicinales para curar sus enfermedades debido a que la medicina moderna se encuentra muy lejos de su alcance por el costo y la accesibilidad de la misma. Inclusive, aun teniendo acceso a la medicina moderna, muchas personas prefieren el uso de productos naturales en la resolución de sus dolencias, argumentando que los productos naturales tienen menos efectos tóxicos o que los fármacos de síntesis no son suficientemente efectivos. (Rojas Karla 2013)

Las formas de preparación de las plantas varían según la vía por la que son administradas y la parte de la planta que se utiliza, así como también la cantidad que se administra. Esta última varía de acuerdo con diversas características, pero existen cantidades que

repetidamente se usan en las distintas etnias; estos conocimientos van pasando a través de las generaciones para seguir manteniendo sus tradiciones a través del tiempo, a pesar de los avances en medicina moderna, la cual se orienta más al uso de productos farmacéuticos de síntesis o semisíntesis cuya base en muchos casos es proveniente de estas plantas. Aun así, muchas de las plantas se han ido formulando en tiendas o establecimientos de expendio de productos naturales en diferentes formas de administración, incluso siendo mezcladas con otras plantas, dando respuesta a la persistente demanda de la medicina tradicional, por parte de la población. Dada esta persistencia de uso y consumo humano también se hace evidente la necesidad de demostrar la inocuidad de estas plantas y los márgenes de seguridad y toxicidad, para mejorar los tratamientos tradicionales y evitar posibles consecuencias adversas y efectos colaterales indeseables.

Los estudios de la inmunomodulación por plantas medicinales con actividad beneficiosa para la respuesta inmune por su reportada efectividad en el control del daño en enfermedades o negativa por la reducción de la respuesta (inmunosupresión) en los casos en los que ésta determine afectación del funcionamiento y a integridad de los tejidos, son muy escasos en productos naturales de nuestro medio, particularmente de aquellos que tienen propiedades sobre la inmunidad innata. Siendo esta última uno de los principales motores en la resolución de enfermedades, este estudio, fue diseñado para explorar la actividad de los extractos de las plantas sobre células sanguíneas. El estudio del encuentro *ex vivo*, entre las células (condiciones de cultivo) y los extractos de las plantas, también está orientado a conocer los márgenes de inocuidad y toxicidad de dichos productos. Así, el poder establecer el papel de estos productos naturales sobre las células del sistema

inmune, las cuales tienen un papel fundamental como principal sistema de defensa del organismo, fue posible de realizar después de conocer los márgenes de seguridad de las concentraciones que se pueden usar in vitro sin observar efectos deletéreos. En este propósito, se ha definido poder examinar el efecto de los extractos sobre las funciones de los leucocitos circulantes como ser: fagocitosis, quimiotaxis y capacidad microbicida, además de poder establecer la respuesta pro o anti inflamatoria a través de la producción de citoquinas, y la activación de Inflamasomas, sin que medie una respuesta inmune específica. Fue importante considerar que los mediadores de las respuestas encontradas tienen un papel múltiple en cuanto a generar otras respuestas en cascada ligadas a las demás partes del sistema inmune.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Hipótesis 1: Los extractos de las plantas estudiadas no modifican la funcionalidad de los leucocitos en la inmunidad innata.

Hipótesis 2: Los extractos de las plantas modifican la producción/liberación de citoquinas involucradas en la inflamación

5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivo General.-

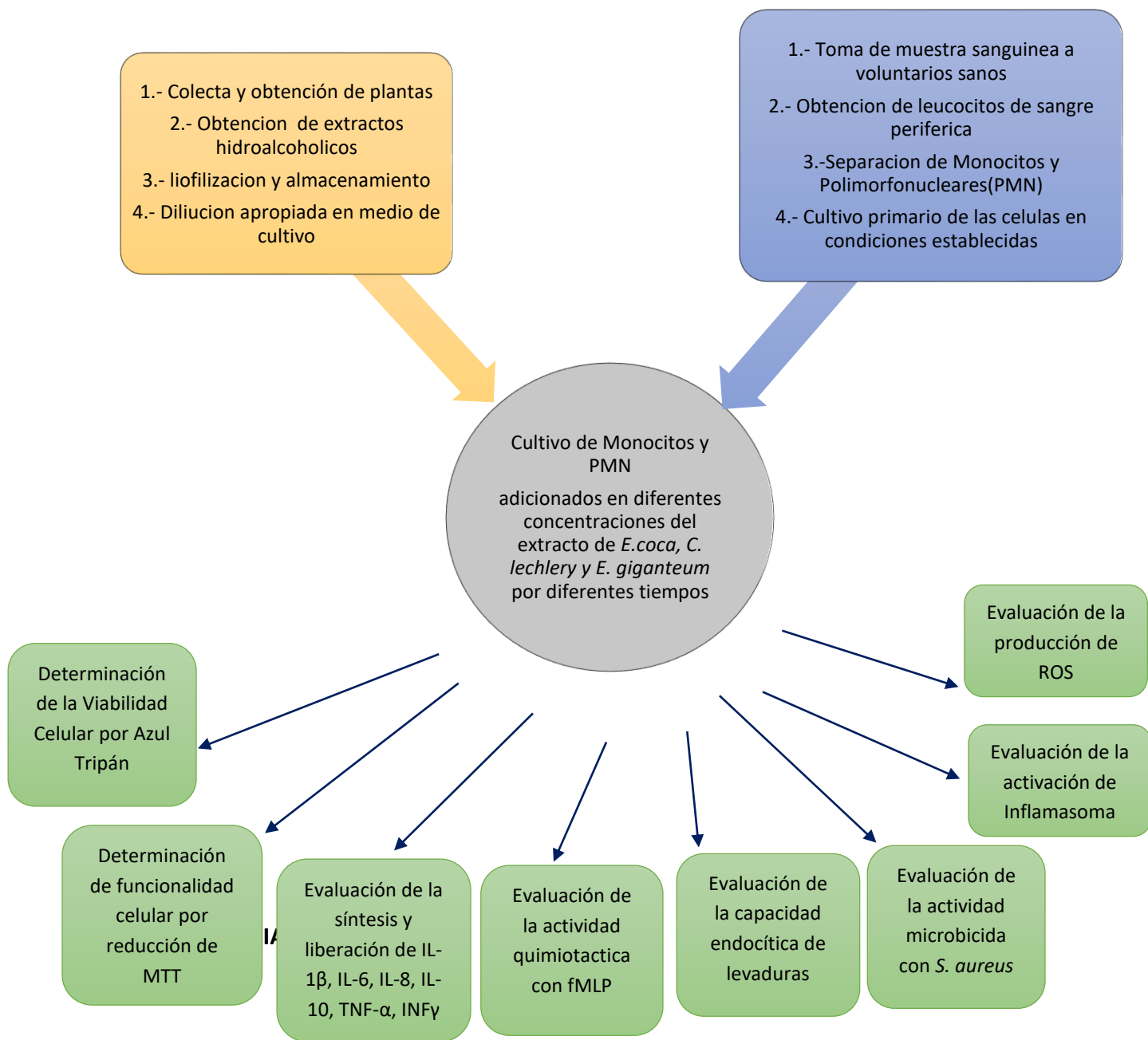
- Evaluar extractos de tres productos naturales de la cuenca Amazónica (*Equisetum giganteum*, *Croton lechleri* Müll.Arg y *Erythroxylum coca*) en su efecto modulador de la respuesta de la inmunidad innata

5.2 Objetivos específicos:

- Evaluar los extractos de *Equisetum giganteum*, *Croton lechleri* Müll.Arg y *Erytroxylum coca*, en su capacidad de modificar la viabilidad de células mononucleares y polimorfonucleares humanas, como principales componentes celulares de la inmunidad innata
- Evaluar el efecto de estos extractos en la funcionalidad celular medida con la actividad enzimática de óxido-reductasas de células mononucleares y polimorfonucleares circulantes.
- Determinar el efecto de estos productos naturales en la funcionalidad celular a través de: a) evaluación de la actividad quimiotáctica *in vitro* de células polimorfonucleares, en respuesta al quimioattractante fMLP; b) evaluación de la capacidad endocítica y microbicida de células polimorfonucleares y mononucleares; c) evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno por neutrófilos.
- Explorar propiedades inmunomoduladoras de estos extractos a través de la determinación *in vitro* de la producción de: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , e INF γ por células mononucleares circulantes humanas estimuladas por los extractos mencionados
- Evaluar el efecto de los extractos de *Equisetum giganteum*, *Croton lechleri* Müll.Arg y *Erytroxylum coca*, en la activación y transcripción de componentes de Inflamasoma NLRP3 y AIM2 y actividad de caspasa-1.

6. METODOLOGÍA:

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL



6.2 Material vegetal. -

Los especímenes de *E. giganteum L.*, *C. lechlery* fueron colectados de la selva tropical del Jardín Botánico de la Amazonía Tumupasa (14°08'40,1280 "y 67°50'55,5244") Provincia

Iturralde de La Paz-Bolivia, con personal involucrado en el Programa Integral Biológico-Jardín Botánico (PIB-JB) de la Universidad Mayor de San Andrés. Las raíces de *Equisetum giganteum* L. se recolectaron en abril de 2014 y julio de 2015, mientras que en Julio de 2014 se recogió la corteza de *Croton lechery*. El material fue protegido de la humedad, y secado a la sombra a temperatura ambiente. El material seco se trituroó y después se remojó al 0,2% p / v en una solución de agua/etanol (5:5v / v) para *Equisetum giganteum* L. y (7: 3 v / v) para *C. lechery*, durante 72 horas en agitación a temperatura ambiente. El extracto se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y luego se filtró en papel de filtro Whatman nº 1. El disolvente se evaporó a 65 ° C en un evaporador rotatorio Buchi-RE111, bajo presión reducida. El material restante se liofilizó usando un sistema de liofilización de Labconco hasta que se obtuvo un peso constante. El material liofilizado se almacenó a -20°C. Antes de su uso, se preparó una solución madre de los extractos vegetales disolviendo el material liofilizado en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 8% (v / v) para crear una solución madre de 50 mg / ml y a partir de la cual se preparó diluciones en medio de cultivo RPMI-1640.

Las hojas de coca fueron provistas por los técnicos del Viceministerio de la Coca y Desarrollo Integral, provenientes de un cultivo en parcela controlada en la región de Los Yungas (Coripata), en la que no se aplicaron productos químicos en calidad de pesticidas.

Para eliminar partículas y microorganismos que pudiera contener el producto, este fue lavado con agua corriente y después sumergido por 5 minutos 3 veces, de manera continuada y secuencial, en una solución de etanol al 70 % en agua tri-distilada. Después se secaron las hojas a temperatura ambiente. Una vez secas las hojas fueron molidas en molino con cuchillas de acero inoxidable (BUHLER MIAG Milán) a diámetro semi-fino (como

harina), material que fue macerado en una solución de etanol con agua al 50 % en proporción 100 gramos de hoja por 1 litro p/v. por 48 horas. El sobrenadante fue filtrado en papel Whatman N°3 y sometido a evaporación en rotaevaporador para eliminar el alcohol. El agua fue eliminada por liofilización en un equipo Labconco. Se logró un polvo fino, que fue conservado a 4°C hasta su uso. El rendimiento promedio fue de 16%. el extracto hidroalcoholico es equivalente a 3 gramos de harina de coca que fueron evaluados en animales de experimentación en estudios previos [\(ref.\) Tesis de Mery. Telf 71231765](#). Las diluciones fueron realizadas en medio de cultivo RPMI 1640.

6.3 Donantes voluntarios

Las células sanguíneas fueron obtenidas de sujetos de un rango de edad entre los 25-35 años de ambos sexos. Para establecer su condición de salud fueron sometidos a exámenes clínicos: radiografía AP de tórax, ecografía exploratoria de abdomen y análisis clínicos de sangre y examen físico general. Todos firmaron su respectivo consentimiento informado. Los resultados de las pruebas químicas mostraron resultados dentro de la normalidad fisiológica.

6.4 Separación y obtención de células

Las células se obtuvieron mediante separación por gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque, a partir de sangre periférica heparinizada extraída por punción venosa de humanos voluntarios aparentemente sanos (Boyum 1968, English y Andersen 1974, Bøyum, Løvhaug y Cols. 1991, Corredor R 1994). El medio de separación utilizado consiste en una mezcla de dos componentes; **ficoll 400**, polímero sintético de sacarosa y

epiclorhidrina, de 400.000D, soluble en agua y **diatrizoato de sodio** (que sustituyo al metrizoato de la fórmula original de Boyum), compuesto que, al ser mezclado con el Ficoll, forma soluciones de baja viscosidad y alta densidad. La función del diatrizoato es proveer tanto la densidad óptima para la separación como la osmolaridad adecuada para mantener la viabilidad de las células. Además, el Ficoll causa la aglutinación de los eritrocitos, lo cual facilita aún más su sedimentación.

En nuestro estudio se procedió a mezclar la sangre en partes iguales con una solución de PBS pH: 7,2 y luego se procedió a la centrifugación y separación por gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque de dos densidades diferentes, (Histopaque, Sigma-Aldrich, $\delta=1,077$ g/cm³) para separar células mononucleares, a 1500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, e Histopaque $\delta= 1,119$ g/cm³ (Sigma-Aldrich) para separar células polimorfonucleares a 1550rpm por 20 minutos. Se recolectó la interfase de células mononucleares en un tubo, para luego separar las células polimorfonucleares ubicadas en la interfase entre el ficoll-hypaque y los eritrocitos; las células obtenidas tanto mononucleares como polimorfonucleares se lavaron por separado tres veces con PBS centrifugando a 1100 rpm, se eliminó los glóbulos rojos por lisis con agua destilada y se resuspendió en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (penicilina y estreptomina), para luego determinar los parámetros en estudio, en las condiciones diferentes que se describen en el protocolo experimental.

6.5 Viabilidad celular por la técnica de exclusión con Azul Tripán

La técnica de Azul Tripán se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el Azul Tripán, la Eosina o el

Propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba, una suspensión celular se mezcla con un colorante y luego se examina visualmente para determinar las células que toman o excluyen dicho agente tintóreo. (Strober 2015).

Para nuestro estudio se procedió a mezclar 0.20 microlitros de la suspensión celular con 0.20 microlitros de la solución de Azul Tripan al 0.4% (relación 1:1); posteriormente se cargó a una cámara de Neubauer para realizar el conteo en microscopio, donde se contaron las células viables, de una tonalidad refringente, y las células no viables teñidas de azul. Se contó 4 cuadrantes de la cámara sección de conteo de glóbulos blancos (Strober 2001) y se hizo el cálculo de viabilidad y número de células con la fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\# \text{ de células vivas}}{\# \text{ Total de células}} \times 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \# \text{ de Células vivas} / 4 \times (\text{factor de dilución}) \times 10^4$$

6.6 Ensayo con Sal de Tetrazolio MTT

Las sales de Tetrazolio se han convertido en una de las herramientas más utilizadas en biología celular para medir la actividad metabólica de diversos tipos de células, que van desde las de mamíferos hasta las de origen microbiano. El MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) ha sido ampliamente utilizado en los laboratorios de investigación, como se evidencia en los artículos publicados que incluyen esta técnica. La cantidad de formazan (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) que se genera es directamente proporcional al número de células viables. Éste es un precipitado de cristales

de color violeta que se disuelve y se mide registrando cambios en absorbancia (a 405nm/630nm) usando un espectrofotómetro de lectura de placas.

La mayor parte de los estudios indican que el cofactor de nucleótido de piridina reducido, NADH, es el responsable de la mayor parte de la reducción de MTT lo cual está respaldado por estudios con células enteras. La reducción del MTT se asocia no solo con la actividad de las mitocondrias, sino también con la del citoplasma y con la de las membranas no mitocondriales que incluyen el compartimento endosoma/lisosoma y la membrana plasmática (Bernas y Dobrucki 2002). La reducción celular del MTT se limita a las vesículas perinucleares, algunas de las cuales se identifican como endosomas/lisosomas. Además, la membrana lipídica, no es permeable a el MTT. Diversos datos sugieren que el MTT es absorbido por las células mediante endocitosis y es reducido por una reductasa N-flavinoxidasa sensible a la etil-maleimida (NEM). El MTT formazán luego se transporta a la superficie celular mediante exocitosis (Liu, Peterson y Cols. 1997).

Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de formazán de color púrpura, este se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células y se deposita cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo. El formazán debe solubilizarse antes de registrar las lecturas de absorbancia. Se han utilizado diversos métodos para solubilizar el producto de formazán, que permitan estabilizar el color, evitar la evaporación y reducir la interferencia causada por el rojo de fenol y otros componentes del medio de cultivo (Vistica, Skehan et al. 1991). En este estudio después de varios ensayos sistemáticos se utilizó etanol absoluto para disolver los cristales y el medio de cultivo sin colorante Rojo Fenol.

Cuando las células mueren, pierden la capacidad para convertir MTT en formazán, por lo tanto, la formación de color es útil y sirve como conveniente marcador de solo las células viables (Berridge, Herst y Cols. 2005). El concepto acerca de que las sales de tetrazolio son metabolizadas solamente en la mitocondria activa de células viables viene de muchos estudios que muestran que se necesita una mitocondria integral la cual, a través de la succinato deshidrogenasa, está involucrada en la reducción del MTT (Riss, Moravec et al. 2004). La reducción de MTT a formazán se da mediante la reacción:

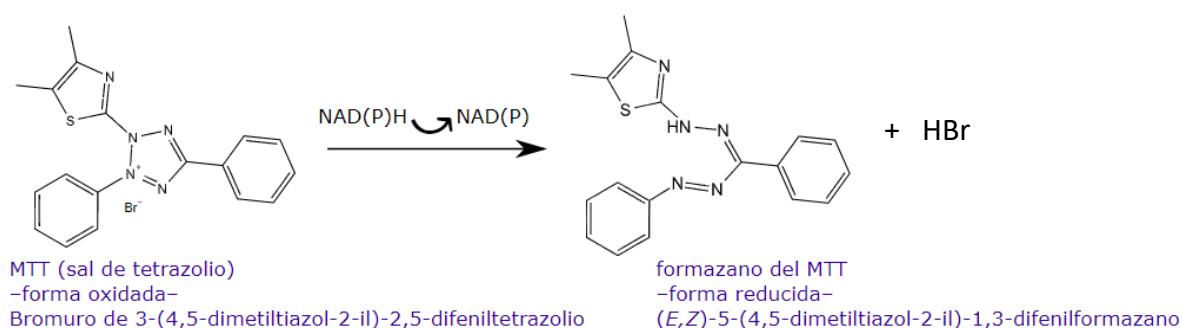


Figura 5. Reacción de Reducción de MTT

Nuestro ensayo se basó en una modificación del método original de (Mosmann 1983). La reducción celular de MTT se realizó mediante la incubación de 1×10^6 cel/ml en placas de cultivo de 96 pozos las cuales se pusieron a incubar en diferentes tiempos (24 y 48 horas) con diferentes concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de *Erytroxylum coca*, *Equisetum giganteum*, *Croton lechleri*. El MTT (Sigma-Aldrich) fue disuelto en una solución buffer fosfato salina (PBS) de pH:7,2, para obtener una concentración de 5mg/ml y luego se hizo una dilución en RPMI sin Rojo Fenol para una concentración final de 1mg/ml. Se esterilizó por filtración (filtro millipore 0.2 μ m); luego se lavaron las células por centrifugación con PBS para retirar restos de los extractos; posteriormente se adicionó 100

μl de la solución de MTT en los pozos con la suspensión celular y se incubo por 4 horas a 37°C, 99% de humedad y 5% CO₂ en oscuridad. Para disolver los cristales de formazán generados, se añadió etanol absoluto y luego la absorbancia fue determinada en el sobrenadante a 405 nm con filtro diferencial de 630 nm en lector de ELISA (AWARENESS INC, USA).

6.7 Determinación de la actividad quimiotáctica

Para estudiar este proceso se imita a lo que ocurre en los tejidos (tejido conjuntivo con mallas de clagena) utilizando un gel en cuyas mallas ocurre la migración de leucocitos. En este método, la distancia recorrida por los fagocitos se da sobre una superficie de gel de agarosa. El péptido quimio-attractante usado fue N-formyl-methionyl-Leucyl-phenylalanine (f-MLP). Este péptido aislado, de los cultivos de *Escherichia coli*, se forma al inicio de la síntesis de las proteínas en procariontas y su presencia en el sitio de infección permite detectar a los microorganismos por células de la defensa innata; funciona como quimioattractante y potente "activador" de los fagocitos polimorfonucleares y mononucleares, los cuales ligan f-MLP a través de receptores FP específicos (FPRs). La unión de f-MLP a sus receptores específicos de la superficie celular desencadena diferentes cascadas de eventos bioquímicos, conduciendo, eventualmente a diferentes respuestas celulares. Entre estas, se cita la polarización morfológica, la locomoción, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la secreción de enzimas lisosomales, y la generación de mediadores lipídicos, entre las más estudiadas. Todas las respuestas anteriores, referidas como "activación de neutrófilos", puede representar la primera línea de defensa para la destrucción de microorganismos invasores.

El procedimiento de determinación de la quimiotaxis fue realizado a partir de la modificación de los métodos de Dahl and Lindroos (1979) y Chenoweth, Rowe et al. (1979). Para esto, se disolvió una mezcla de agarosa al 2% con gelatina sin sabor al 0.5% como matriz de proteínas; la solución se mezcló con RPMI 2X pH:7,4 y luego se vaciaron en placas Petri de vidrio. Después de gelificarse se realizaron perforaciones o pocitos en el gel en tres líneas paralelas. Se preparó el péptido quimio-attractante N-formyl-methionyl-Leucyl-phenylalanine (f-MLP, Sigma. Co) disolviéndolo en PBS (Buffer fosfato salino) a una concentración final a 10^{-7} M (Showell, Freer et al. 1976). Posteriormente se colocó $10\mu\text{l}$ de PMN (1×10^5 cel) en los pocillos del centro, previamente incubados con los extractos a diferentes concentraciones, $10\mu\text{l}$ del péptido quimiotáctico f-MLP en los pocillos superiores y $10\mu\text{l}$ de medio RPMI en los pocillos inferiores. Se dejó en incubación por 2 horas a 37°C y luego se detuvo la migración con la adición de metanol absoluto por 30 minutos, para luego cambiar con metanol fresco. Se dejó 18 horas de fijación, luego se procedió a colorear con tinción Panóptica Rápida y se dejó secando para después observar con microscopio óptico 10X y medir la migración al origen en milímetros del frente de migración al origen (Nelson, Quie y Cols. 1975), (Schiffmann, Corcoran y Cols. 1975), (Jacob John y Sieber 1976).

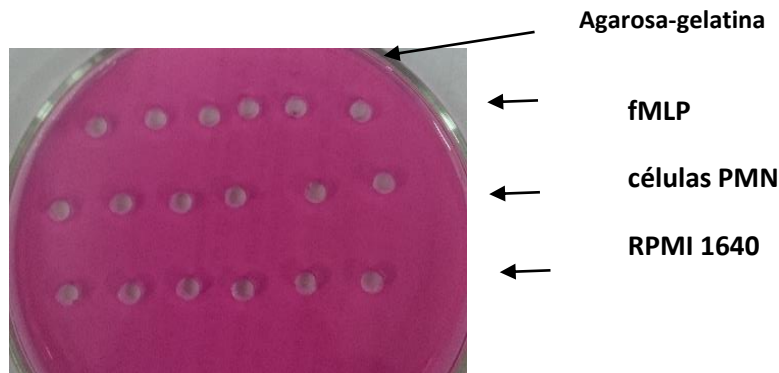


Figura 6.- Placa de gel-agarosa con la localización de distribución de los elementos en los pozos

6.8 Ensayo de Capacidad Endocítica

La determinación de este proceso se obtuvo con la aplicación de técnicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los primeros, que se basan en la medición del aclaramiento de sustancias inyectadas en un animal, tienen la desventaja de estar influenciados por muchas variables desconocidas, como Factores humorales, el flujo sanguíneo, la concentración de partículas, el número, el estado funcional de las células fagocíticas y otros. También están limitadas por el hecho de que las mediciones se refieren principalmente al funcionamiento de las células de Kupffer y, en menor medida, a la de los macrófagos del bazo. Los estudios realizados *in vitro* tienen la ventaja de que se pueden usar fagocitos y partículas homogéneas, bien definidas y caracterizadas. Los experimentos de fagocitosis se pueden realizar con células en diferentes estados funcionales y en diversas condiciones experimentales, por ejemplo, células fagocíticas adheridas a superficies de vidrio o plástico o en suspensión. Sobre esta base, se han desarrollado técnicas de varios tipos para medir la fagocitosis *in vitro*. Por ejemplo, el número de partículas (microorganismos, células de

levadura, partículas de látex o gotitas de aceite) ingeridas por célula puede determinarse microscópicamente. El número de microorganismos ingeridos se puede determinar con el uso de organismos, vivos o muertos, radiomarcados después de la eliminación de la población extracelular. La ingestión de microorganismos viables también se puede medir microbiológicamente en función de su desaparición extracelular (Leijh, van den Barselaar y Cols. 1979).

La medición de la capacidad de fagocitosis en este estudio, se realizó usando levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (Fleishmann, La Paz) las cuales fueron hidratadas con PBS a temperatura ambiente tres horas antes del ensayo; estas se dejaron en reposo, disgregando los cúmulos por acción del Vortex cada 15 minutos dejando levaduras separadas en suspensión. Para el ensayo se tomó las levaduras que se encontraban en el sobrenadante, se centrifugaron a 1500 rpm para ser concentradas; se lavó dos veces el pellet con solución de PBS y se resuspendió en 1ml de la misma solución. Se determinó la población de levaduras por conteo en cámara de Neubauer con objetivo 40X. Posteriormente, se puso en contacto las levaduras con suero humano normal 1:1 para ser opsonizadas (C3b,C3bi, IgM), en un volumen de 400 microlitros, con las células previamente cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de *Erytroxylum coca*, *Equisetum giganteum* L., *Croton lechleri* por 3 horas; la proporción levaduras: células tuvo una relación 1:2. Luego se lavó con PBS para retirar las levaduras no endocitadas y después proceder a fijar y teñir con Tinción Panóptica Rápida. Se observó con objetivo de inmersión y se realizó el conteo en 5 campos de células. Para determinar el *índice fagocítico* se calculó, mediante la fórmula, el promedio del número de levaduras fagocitadas/100 células.

6.9 Ensayo de capacidad microbicida

Para la evaluación de la capacidad microbicida de las células mononucleares y polimorfonucleares, se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) identificada y proporcionada gentilmente por el laboratorio de bacteriología del Instituto SELADIS. El método usado fue una modificación de los protocolos de Heather A. Parker (2014) y Hampton, Vissers y Cols. (1994) y Leijh, Van Den Barselaar y Cols. (1981)

Este ensayo microbiológico tiene la ventaja de evaluar un mecanismo fisiológico. El conteo de colonias no requiere equipo costoso y especializado, y la medición de la viabilidad también abre la posibilidad de una determinación simultánea de la destrucción bacteriana. El punto de referencia para la muerte microbiana es la pérdida de la capacidad de las bacterias para formar colonias después de colocarlas en agar nutritivo. Hampton et al., en 1994 midió las vidas medias para la muerte de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, para realizar una coordinación frente a los tiempos de fagocitosis y muerte de las células suponiendo que una única bacteria viable produce cada colonia. Para propósitos inmunológicos, la capacidad de formación de colonias sigue siendo la mejor evaluación de la actividad bactericida de los neutrófilos.

En esta investigación se procedió previamente a determinar la concentración bacteriana ideal a ponerse en contacto con las células y la curva de crecimiento microbiana mediante el uso de la escala de Mac Farland, comprobada con la lectura en espectrofotómetro a 625 nm para ser relacionado con el método de conteo de colonias en placa.

Al iniciar el ensayo de la capacidad microbicida se tomó una cantidad de colonias de 18 horas de cultivo para llevar a una suspensión de concentración de 2×10^7 bacterias/ml. Con anterioridad se puso a incubar por 3 horas las células fagocíticas en presencia de los extractos de las plantas por tiempos y dosis en los cuales se estableció previamente que hay un mantenimiento de la viabilidad celular por la técnica del Azul Tripán. Las células se llevaron a una concentración de 2×10^5 cel/ml, y se incubaron con los extractos hidroalcoholicos de las plantas a diferentes concentraciones; posteriormente se cambió el medio de las células por uno fresco y luego se puso en contacto las células incubadas con la suspensión de bacterias; después de ser agitada la mezcla, se centrifugo a 1100 rpm durante 15 minutos y luego se desechó el sobrenadante para proceder a sembrar por triplicado en Agar Sangre un tubo control a tiempo 0 para determinar el número de bacterias real en contacto con las células posterior a la centrifugación. En los demás tubos se dejaron incubando las células con las bacterias durante 3 horas a 37°C y 5% de CO_2 para que se lleve a cabo la fagocitosis, se lavó el pellet con PBS y se recolecto y sembró los sobrenadantes por triplicado. Luego de esto se resuspendió el pellet en medio RPMI y se colocó en placas de 96 pozos para incubar por 30 y 60 minutos para que se lleve el proceso de digestión de lo endocitado; posterior a este tiempo, se detuvo este proceso por adición de agua albuminada al 0,1 % y un cambio brusco de temperatura de 37°C a -20°C para que se lleve a cabo además la lisis de las células y a liberación de las bacterias viables, luego se sembró por triplicado en Agar Sangre cada una de las variables y se realizó el conteo de numero de colonias formadas para determinar el número de UFC/ml.

6.10 Detección de citoquinas

Las citoquinas se detectaron en el sobrenadante de células mononucleares cultivadas con los extractos a diferentes concentraciones. Se dividieron las células en 2 grupos: uno de ellos se incubó con los extractos y el otro contenía células previamente activadas con Lipopolisacárido (LPS), dado que este estimulante es el más versátil en concentración de 10µg/ml (Olaf Gross, Thomas Christina, Guarda, & Tschopp, 2011).

Para la obtención de sobrenadantes de cultivo celular se realizó el cultivo por 24 horas con los extractos de las plantas en las dosis más relevantes obtenidas con los resultados previos de funcionalidad celular. Posteriormente el cultivo de las células se centrifugó y se recolectó los sobrenadantes los cuales se congelaron a -20°C hasta su uso.

La liberación de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, e INFγ en sobrenadantes de cultivo celular fue analizada usando el kit HU OptEIA SET (B&D Bioscience), el cual está caracterizado por ser un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de tipo sándwich indirecto de captura de antígeno, en el cual los pocillos fueron recubiertos con un anticuerpo monoclonal humano anti-cada una de las citoquinas. Después de lavar el exceso de anticuerpo libre se colocó el sobrenadante problema en el que es retenida la interleucina de manera específica en el pocillo por ser reconocida por el primer anticuerpo fijado; después de un segundo lavado se aplicó la solución del anticuerpo biotinilado de detección monoclonal anti-antígeno (citoquina); posterior a eso se realizó un lavado más, se añadió la solución de sustrato y luego la solución de paró para llevar a lectura de densidad óptica a 450nm. (ELISA, Springer Ebook)

6.11 Ensayo de Activación del Inflamasoma.

Las células PBMC y los neutrófilos se incubaron durante 3 horas a 37°C ($2,5 \times 10^5$ células/200 μ l en placas de 96 pocillos y 5×10^5 células/200 μ l en placas de 96 pocillos) en medio completo de Iscove y RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) con los extractos de plantas a 10 μ g/ml y 100 μ g/ml y con los activadores del Inflamasoma: -Sal sódica del ácido polidesoxiadenílico-timidílico (poly dA: dT) (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) para AIM2 y Nigericina 10 μ g para NLRP3. Antes de la estimulación, el poli dA:dT se complejó con el reactivo de transfección Lipofectamine2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para el cebado, las células se trataron con LPS (30ng) durante 3 horas y luego se añadieron los activadores del Inflamasoma y los extractos de plantas.

Para evaluar la inhibición de la activación del Inflamasoma, las células se incubaron primero con los extractos de plantas durante 1 hora y luego se añadieron los activadores del Inflamasoma durante tres horas.

Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior para medir la IL-1 β y la LDH.

6.12 Actividad de la Caspasa-1 por FACS.

La actividad de la caspasa-1 se midió en las células después de 3 horas de cultivo con los extractos de cada planta y con activadores del Inflamasoma: poli dA:dT o lipofectamina (control) para AIM2, y con nigericina para NLRP3 utilizando el kit de ensayo de la caspasa 1

FAM-FLICA1 (ImmunoChemistry Technologies, MN, USA), para su aplicación en el clitómetro de flujo (FACS) Verse BD Biosciences, según las instrucciones del fabricante.

La técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia *FACS* por sus siglas en inglés (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) es un tipo especializado de citometría de flujo. Esta técnica provee un método para la clasificación y selección de células provenientes de una mezcla de varias poblaciones en dos o más contenedores de a una célula por vez, según las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula. Es un instrumento científico de gran utilidad ya que provee un método de grabación de datos provenientes de las señales de fluorescencia de cada célula que es a la vez rápido, objetivo y cuantitativo; además permite la separación física de aquellas células pertenecientes a una población de interés.

6.13 Expresión del ARNm de AIM2 y del ARNm de NLRP3.

Se analizaron los niveles relativos de ARNm de AIM2 y de ARNm de NLRP3 en células aisladas que habían sido activadas *in vitro*. Brevemente, las células se lisaron con 350 µl de tampón de lisis (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN total se extrajo con un kit RNeasy Micro (Qiagen) y se trató con DNasa (Qiagen) para eliminar el ADN genómico, utilizando el QIAcube (Qiagen). El ADNc se preparó en una reacción de RT con cebado de hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los niveles de ARNm se determinaron mediante RT-PCR en un sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7 (TaqMan; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (Applied Biosystems). Los pares de sonda-cebador que se usaron fueron para expresión de ARNm de

los genes: AIM2 (Hs00915710_m1), NLRP3 (Hs00918082_m1) y GAPDH (Hs99999905_m1) (TaqMan, Applied Biosystems). Las muestras (10 ng de ADNc) se ejecutaron por duplicado en una mezcla de reacción de 20 μ l (con TaqMan Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems) utilizando el método comparativo $\Delta\Delta$ CT de cuantificación relativa (La cuantificación relativa relaciona la señal de PCR del transcrito objetivo en un grupo de tratamiento con la de otra muestra, como un control no tratado) para calcular las diferencias de expresión génica entre las células de control y las estimuladas. Como control endógeno se utilizó GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) porque se ha establecido que sus niveles de expresión de ARNm son altos y constantes en muchas células y tejidos diferentes, para corregir las variaciones en la carga de la muestra.

6.14 Medición de LDH

Los niveles de LDH se midieron en los sobrenadantes con el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® según las instrucciones del fabricante.

6.15 Medición de ROS

- Medición de ROS extracelular

El isoluminol fue utilizado para medir exclusivamente las ROS liberadas por las células activas, obteniendo una medida relativa de ROS, ya que no cuantifica los moles reales de O₂- presentes en la muestra.

Se preparó un vial de medición de 1 ml que contiene isoluminol (0,1 ml de 0,5 mM), HRP (peroxidasa de rábano) (0,05 ml de 80 U/ml) y células (0,1 ml que contienen 1×10^6 células,

en glucosa Krebs Ringer (KRG) (0,65 ml). Se dejó que las muestras se equilibren a la temperatura deseada y se activó el sistema añadiendo un estímulo (0,1 ml) de f-MLP disuelto en KRG, permitiendo que la adición de f-MLP a los neutrófilos en presencia de isoluminol de lugar a una respuesta de quimioluminiscencia (CL). La actividad CL se midió en un aparato Biolumat LB 9505 de seis canales (Berthold Co., Wildbad, Alemania). Se incubaron las células con el estimulante y los extractos, así como sólo las células con el control positivo del estimulante, para diferenciar la producción de anión superóxido.

- Medición de las ROS intracelulares.

El colorante permeable a la membrana, el luminol, es excitado por las ROS generadas por los fagocitos, dando lugar a la quimioluminiscencia. Añadiendo las enzimas impermeables a la membrana, SOD y catalasa a las mezclas de reacción para eliminar el O_2^- y H_2O_2 secretado, se pueden medir las ROS generadas específicamente en los compartimentos intracelulares (Claes Dahlgren, Karlsson & Bylund, 2007).

Se preparó un vial de medición de 1 ml que contiene luminol (0,1 ml de 0,5 mM), SOD (0,01 ml de 5000 U/ml), catalasa (0,01 ml de 200 000 U/ml) y células (0,1 ml que contienen 1×10^6 células, en KRG (0,68 ml). Se dejó que las muestras se equilibren a la temperatura deseada, se activó el sistema añadiendo como estimulante el PMA (ácido forbol mirístico) (0,1 ml) disuelto en KRG y se registró la producción de luz con un luminómetro en unidades de cpm (cuentas por minuto) (Claes Dahlgren & Karlsson, 1999, Claes -1987).

7. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico fue realizado usando ANOVA de una y dos vías seguido de una prueba múltiple de comparación Dunnett's o Bonferroni, mediante el uso del programa PRISM 7.0® GraphPad software.

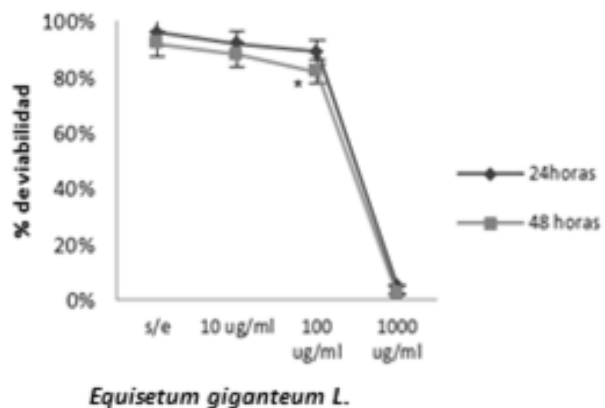
8. RESULTADOS

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA VIABILIDAD CELULAR

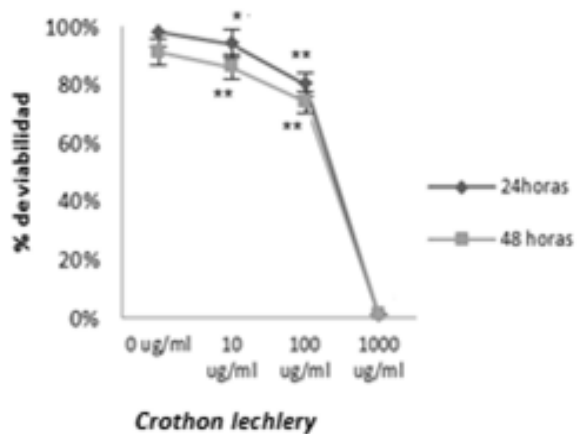
Para explorar un posible efecto toxico de los extractos sobre células humanas de sangre periférica, mononucleares y polimorfonucleares de voluntarios humanos sanos, fueron expuestos a diferentes concentraciones de los extractos, en condiciones de cultivo celular in vitro, por diferentes periodos de tiempo (24 y 48horas) al cabo de los cuales se determinó el porcentaje de viabilidad celular. En la figura 7 se aprecian los resultados de esta determinación en cultivos primarios de mononucleares en presencia de extracto hidroalcoholico de *Equisetum giganteum L.*, *Croton lechlery* y *Erytroxylum coca* a través del método de exclusión con Azul Tripan. Se observó que la viabilidad en presencia de *E. giganteum* (fig. 7 a) se mantiene por encima de 80% con 10 µg/ml y 100µg/ml y se reduce notablemente con 1000ug/ml de extracto concentración en la que ya se observa una toxicidad casi total tanto a las 24 como a las 48 horas. Para el extracto de *Croton lechlery* la cinética de reducción de viabilidades es bastante similar a la anterior con valores menores a las 48 horas (fig. 7b). Para el caso del extracto de *Erytroxylum coca*, la viabilidad de las células se mantiene hasta 1300µg/ml en niveles de 50% y se llega a observar una toxicidad

completa a los 13300µg/ml. Estas cifras nos dan el margen de toxicidad de estos extractos para las siguientes pruebas de funcionalidad.

a)



b)



c)

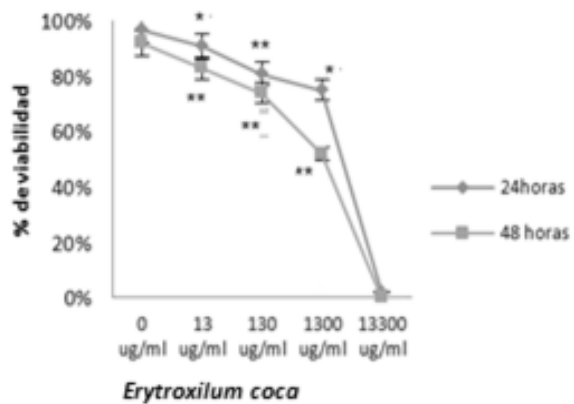
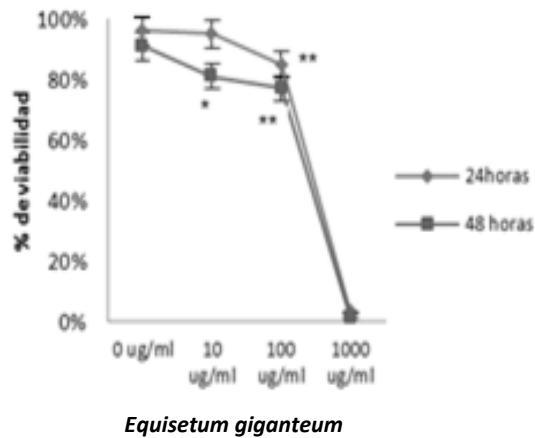


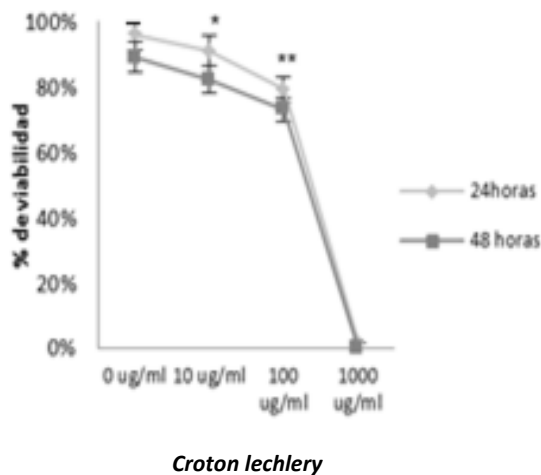
Figura. 7 Evaluación in vitro de la viabilidad de células mononucleares por el método de exclusión con azul tripán en presencia de diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L.(a), *Croton lechleri*(b) y *Erythroxylum coca*(c) a las 24 y 48 horas de cultivo celular. Se expresa como porcentaje de viabilidad el promedio \pm 1SD, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Esta misma evaluación fue llevada a cabo con leucocitos polimorfonucleares obtenidos de los mismos voluntarios sanos. En la figura 8 se puede apreciar que los 3 extractos, no tienen un efecto citotóxico en las concentraciones bajas, apreciándose un mantenimiento de la viabilidad celular, cerca del 80% a las primeras dosis. Sin embargo, se observa una toxicidad alta a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos de *E. giganteum* y *C. lechleri* y en 13300 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto de *E. Coca*.

a)



b)



c)

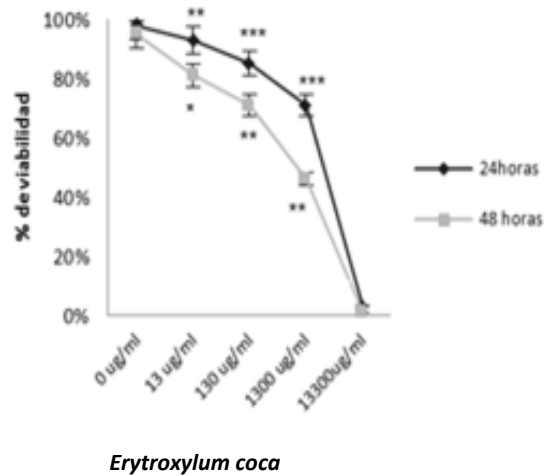
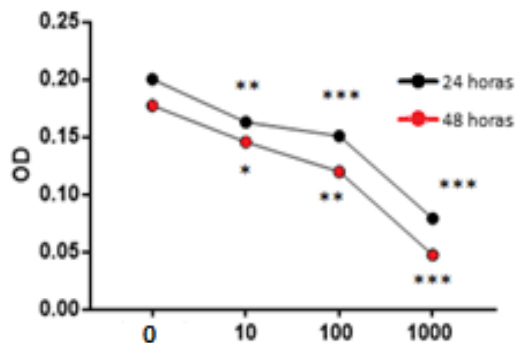


Figura. 8 Evaluación in vitro de la viabilidad celular de polimorfonucleares por el método de exclusión con azul tripán en presencia de diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* L. (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) a las 24 y 48 horas de cultivo celular. Se expresa como porcentaje de viabilidad el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE OXIDOREDUCTASAS

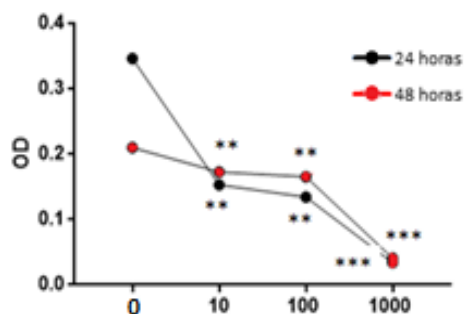
En la figura 9 se puede evidenciar que en células mononucleares existe un descenso de 18 a 25% de la funcionalidad de la actividad enzimática celular de oxidoreductasas con los 3 extractos de una manera dosis dependiente, respecto al control, y no se logra una inhibición total de la misma. A las dosis de 1000µg/ml para el extracto de *E. giganteum*(a) y *C. lechleri*(b) y a la dosis de 1300µg/ml para el extracto de *E. coca*(c) si se observa reducción de casi 50% de la actividad de óxido reductasas y por tanto una evidente toxicidad celular.

a)



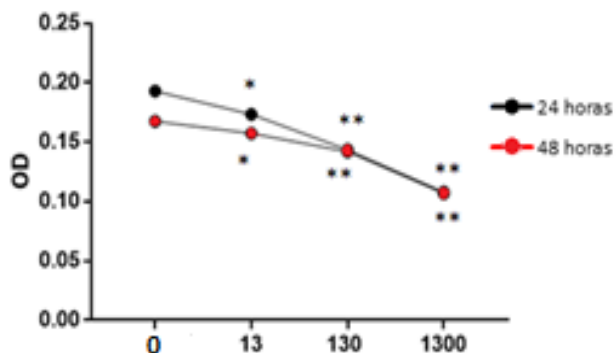
b)

Equisetum giganteum



Croton lechleri

c)

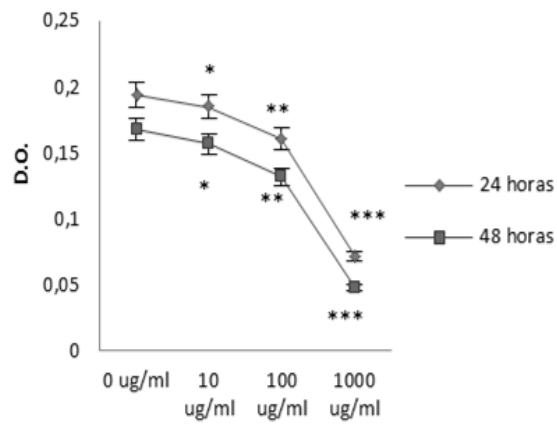


Erytroxylum coca

Figura 9 Evaluación in vitro del efecto de los extractos estudiados sobre la actividad enzimática mitocondrial y citoplasmática de células mononucleares con la sal de tetrazolio MTT. En presencia de diferentes concentraciones de los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) a lo largo de 24 y 48 horas de cultivo de células mononucleares se expresa el promedio \pm 1SD, de la D.O. en tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control se expresa: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

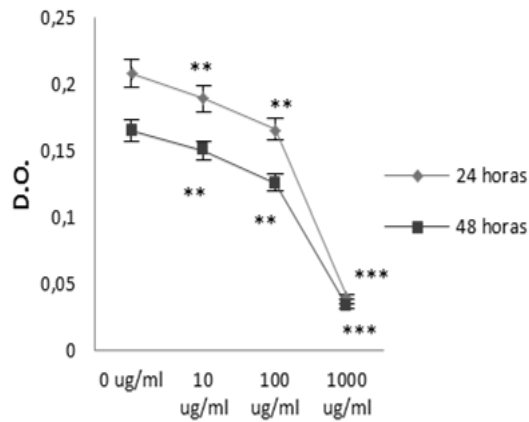
Esta misma evaluación fue realizada con leucocitos polimorfonucleares obtenidos de los mismos voluntarios sanos (figura 10). Se observa que los extractos de *E. giganteum*(a) y *C. lechlery*(b) no tienen un efecto en la actividad enzimática celular en las concentraciones que no son tóxicas en la evaluación con Azul Tripan. Con extracto de *E. coca*(c) se observa una leve estimulación (16% respecto al control) de esta actividad a las dosis intermedias.

a)



Equisetum giganteum

b)



Croton lechlery

c)

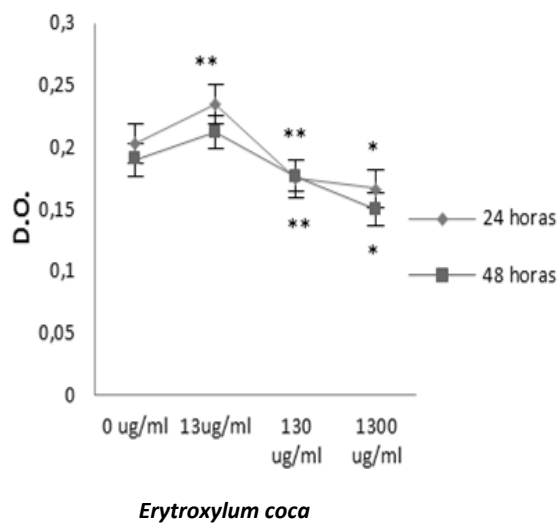


Figura 10 Evaluación in vitro del efecto de los extractos estudiados sobre la actividad enzimática mitocondrial y citoplasmáticas en células polimorfonucleares con la sal de tetrazolio MTT. En presencia de diferentes concentraciones de los extractos *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) a lo largo de 24 y 48 horas de cultivo celular se expresa la D.O. como el promedio \pm 1SD, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control se expresa: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCITICA

Se evaluó la capacidad de las células mononucleares y polimorfonucleares para endocitar partículas en cultivo en presencia de los extractos estudiados. En este caso, las células de sujetos donadores voluntarios previamente tratadas con los extractos se pusieron en contacto con levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*) en condiciones de cultivo celular (temperatura 37°C, 99% de humedad y 5% CO₂) y se determinó por microscopia óptica el número de levaduras endocitadas por cada célula (índice fagocítico). Las concentraciones que se evaluaron fueron aquellas en las que no se observó alteración significativa de la viabilidad celular, según los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad y actividad mitocondrial. En la figura 11 se observa que no existe una modificación estadísticamente significativa de la capacidad de endocitosis de levaduras de las células mononucleares en

comparación con el control para el caso del extracto de *E. giganteum* (Fig. 11a); en el caso del extracto de *C. lechlery* (fig. 11b) se observa un leve descenso (17% respecto al control) de esta función a la dosis de 10µg/ml. Para el caso del extracto de *E. coca* se puede observar un leve aumento (19% de dicha función, aunque no fue estadísticamente significativo).

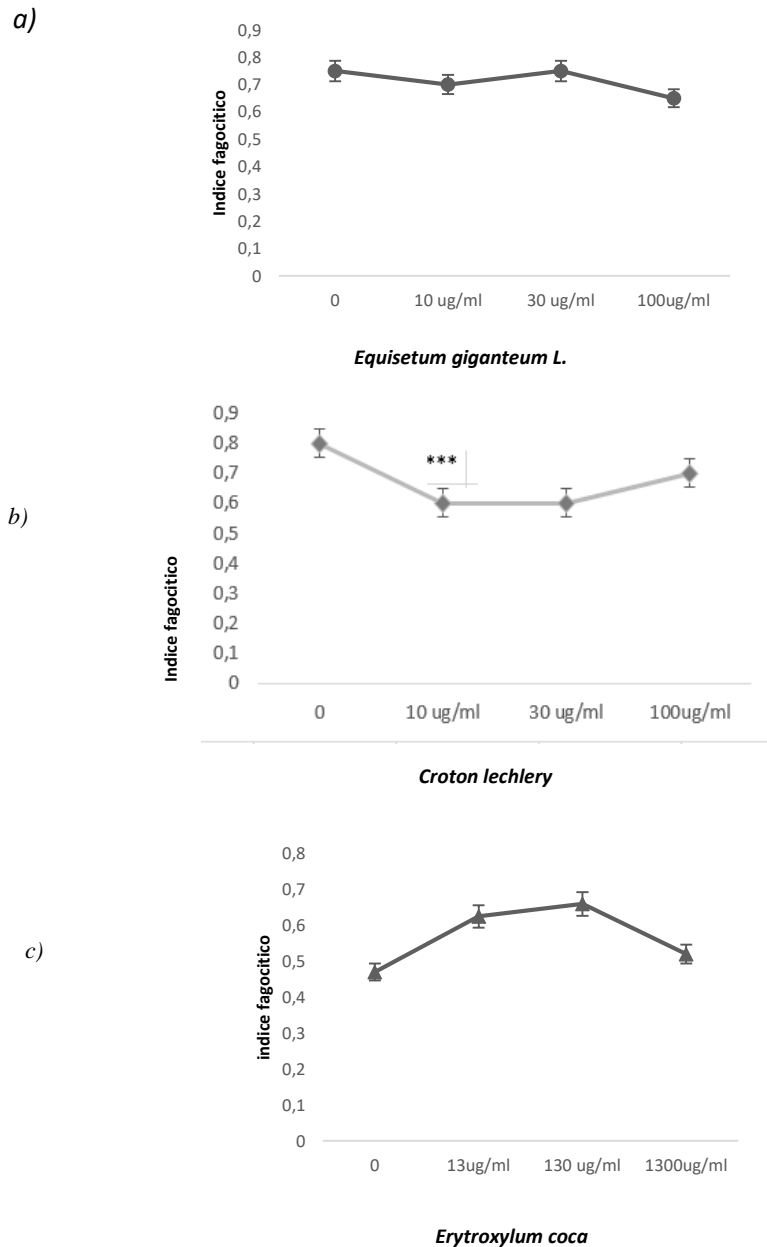
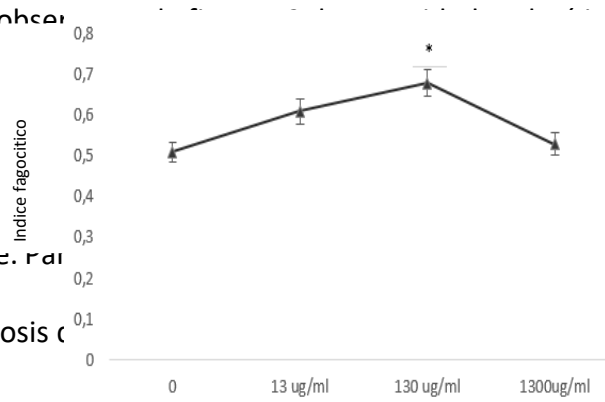


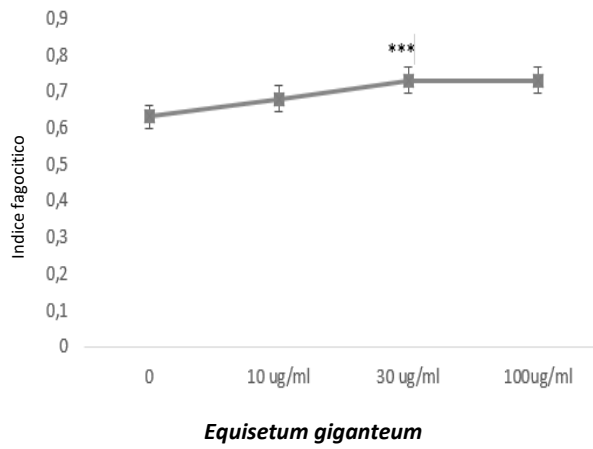
Figura 11 Evaluación in vitro de la capacidad endocítica de levaduras por células mononucleares tratadas con diferentes concentraciones de extracto hidroalcoholico de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechlery* (b) y *Erytroxylum coca* (c) en 3 horas de cultivo celular. Se expresa el índice fagocítico en promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control se expresa: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

Como se puede observar en presencia de respecto al control estadísticamente. Paralelamente, el índice de un 21% a la dosis

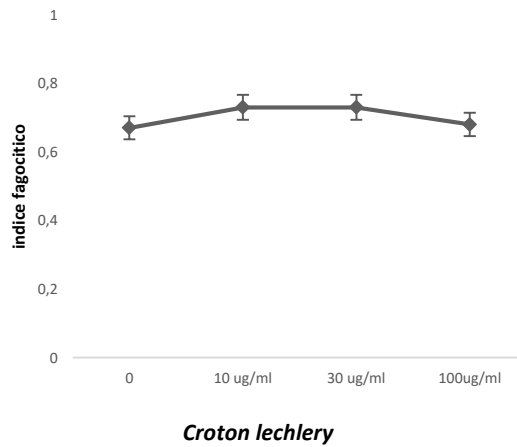


a de los polimorfonucleares a 130 ug/ml se aumentó en un 16% respecto al control. Sin embargo, no hubo cambios significativos en el índice de esta función alrededor

a)



b)



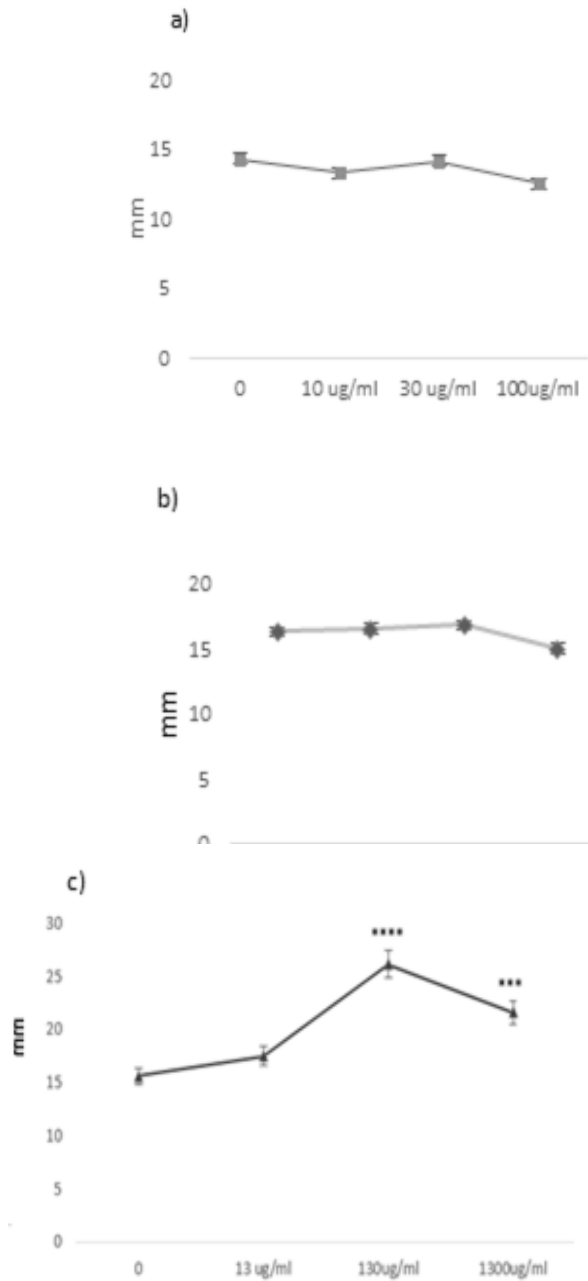
c)

Erytroxylum coca

Figura 12 Evaluación in vitro de la capacidad endocítica de levaduras por células polimorfonucleares tratadas con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) en 3 horas de cultivo celular. Se expresa el índice fagocítico en promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control se expresa: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

EVALUACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS

En este ensayo se evaluó el efecto de los extractos h.a. de *E. giganteum* L., *Croton lechleri* y *E. coca* sobre la actividad migratoria in vitro de polimorfonucleares. Después de incubar las células por 3 horas con los extractos, a diferentes concentraciones, se midió la capacidad de migración hacia un agente quimio-atractivo, el tripéptido formilado N-formyl metyl leucyl-phenylalanina (N-fMLP). La capacidad quimiotáctica se midió en milímetros desplazados entre el sitio de origen de las células en cultivo y el frente alcanzado (ver Material y Métodos) hacia el centro del gradiente de concentración del quimioatractivo. En la figura 13 se puede observar que los extractos de *E. giganteum* L.(a) y *Croton lechleri*(b) no inhiben tal actividad, en cambio puede observarse, en el extracto de *E. coca*(c) estimula esta función de una manera estadísticamente significativa en las dosis más altas del extracto (alrededor del 60% respecto al control).



Erytroxylum coca

Figura 13. Evaluación *in vitro* de la migración de polimorfonucleares tratados con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechery* (b) y *Erytroxylum coca* (c) a lo largo de 3 horas de cultivo celular hacia el péptido quimioattractante N-fMLP. Se expresa la migración en mm del promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue:

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

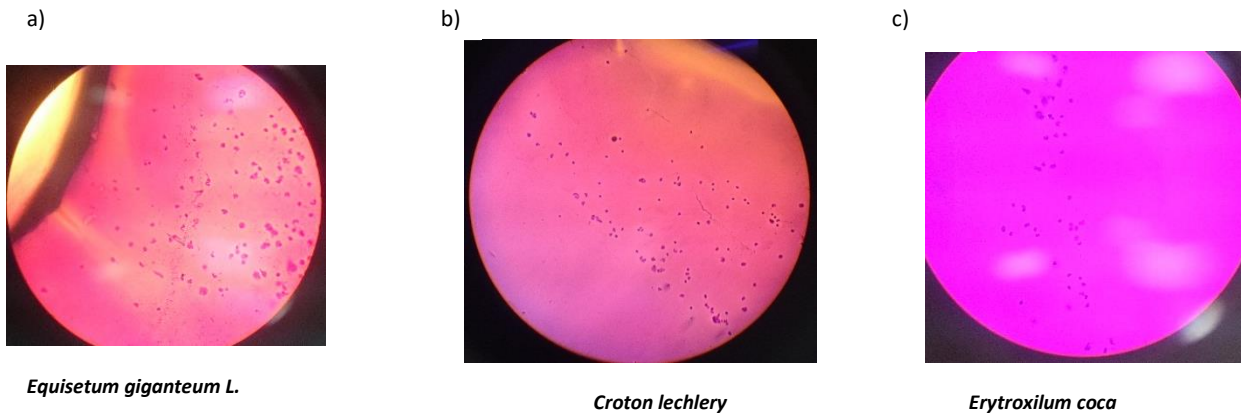
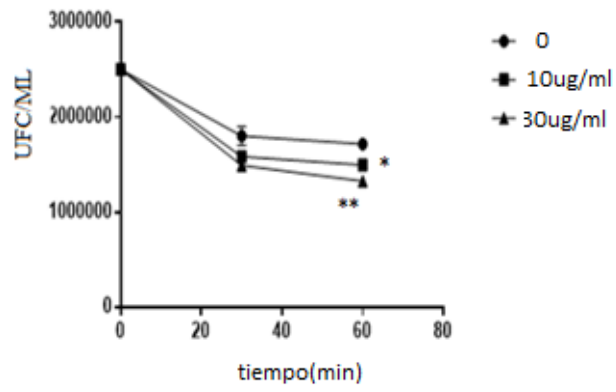


Figura 14 Observación de la Migración de polimorfonucleares desde el pocillo de origen hacia el péptido quimiotactico
 a) Equisetum giganteum L. b) Croton lechleri c) Eryroxylum coca

EVALUACION DE LA CAPACIDAD MICROBICIDA

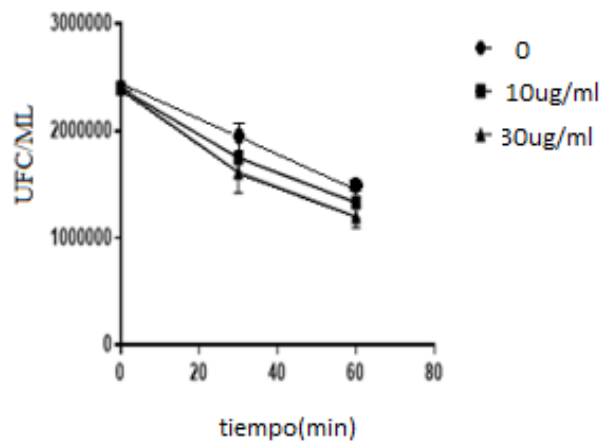
Para conocer si los extractos hidroalcoholicos de *E. giganteum*, *C. lechleri* y *E. coca* tienen algún efecto sobre la capacidad de eliminar microorganismos, de mononucleares y polimorfonucleares humanos en condiciones de cultivo se adicionaron los extractos en diferentes concentraciones cuya inocuidad estaba ya establecida en anteriores experimentos. Se incubó las células tratadas con extractos por 3 horas y después se adiciono un microorganismo patógeno: *Staphilococcus aureus*. En la figura 15 se observa que con *E. giganteum*(a) a la dosis de 10µg/ml y 30µg/ml a los 60 minutos se incrementa levemente la capacidad microbicida de células mononucleares ya que disminuye las UFC de manera estadísticamente significativa en un 40% respecto al control. En los casos de *C. lechleri* (b) y *E. coca*(c) no se observa cambios significativos en esta función.

a)



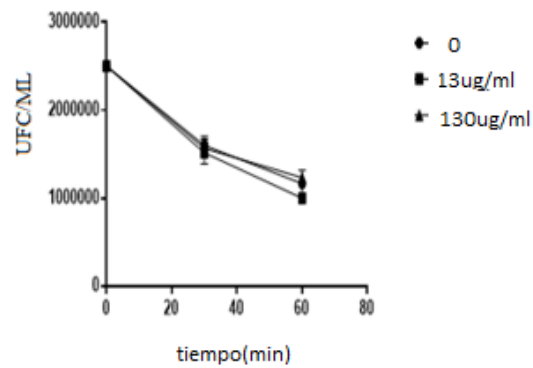
Equisetum giganteum

b)



Croton lechleri

c)

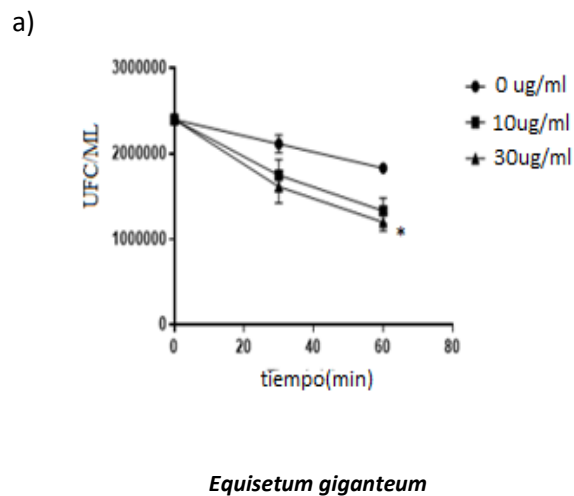


Erythroxylum coca

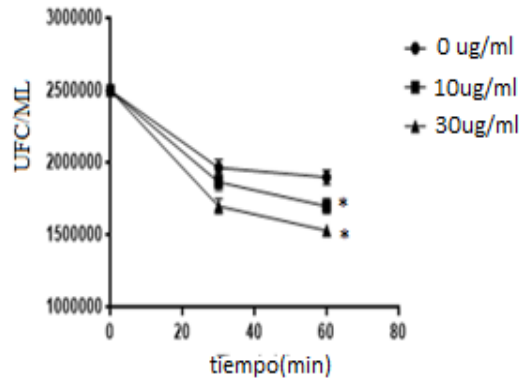
Figura 15 Evaluación de la capacidad microbicida de células mononucleares tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechery* (b) y *Erytroxylum coca* (c). Se expresa el número de UFC en promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue:

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

En la figura 16 se muestra que los extractos estudiados no impiden que las células polimorfonucleares realicen la función de eliminar *Staphilococcus aureus*. En el caso de las células tratadas con el extracto de *E. giganteum*(a) se observa un mayor descenso del número de bacterias ingeridas y digeridas por las células a la dosis de 10 y 30 μ g/ml a 60 minutos (alrededor de un 30% respecto al control), en el caso de las células tratadas con el extracto de *Croton lechery*(b) se observó que a la dosis de 30 μ g/ml existe también un descenso del número de bacterias muertas por las células a los 60 minutos de ingestión (alrededor de un 50% respecto al control). En el caso de la respuesta con el extracto de *E. coca*(c) no se observa cambio significativo en la actividad microbicida.

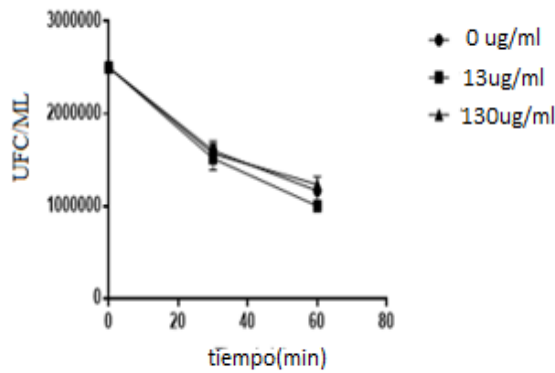


b)



c)

Croton lechleri



Erytroxylum coca

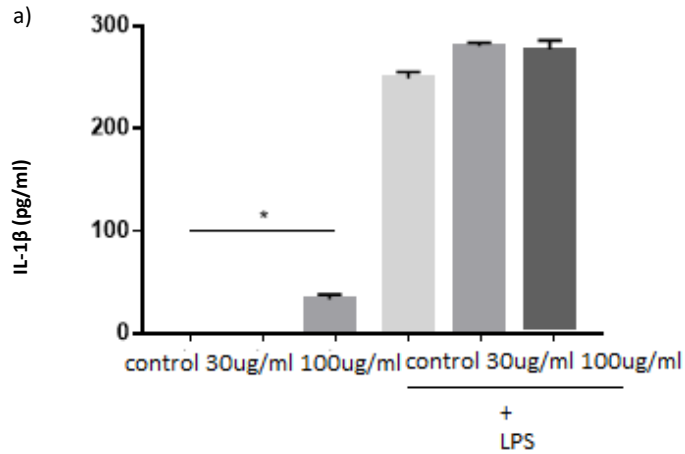
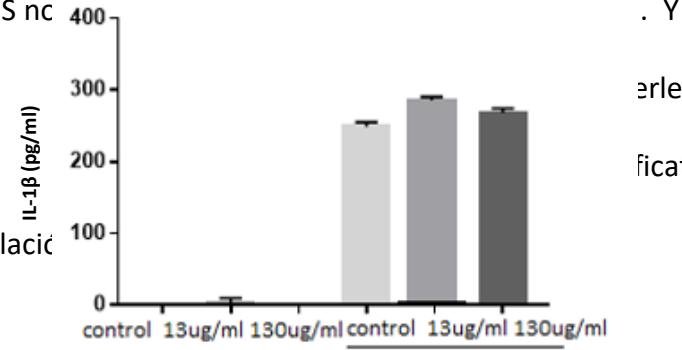
Figura 16. Evaluación de la capacidad microbicida de células polimorfonucleares tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c). Se muestra el número de UFC como el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

EVALUACIÓN DE CITOQUINAS IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , e INF γ .

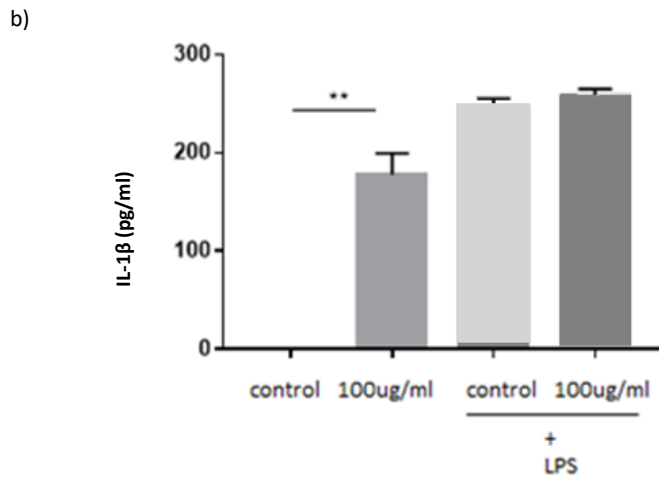
La determinación de IL-1 β en los cultivos celulares tratados con los extractos muestra que en el caso de *E. giganteum*(a) el extracto estimula de manera leve la liberación de esta citoquina en los ensayos sin LPS (33 pg/mL respecto al control), no así en el caso de los ensayos con LPS (Figura 17). Para el extracto de *C. lechleri* (b) se observa la estimulación de la liberación de la IL-1 β en los ensayos sin LPS (38pg/mL respecto al control). En células

estimuladas por LPS no
E. coca (c) existe u
 ensayos con estim
 ensayos sin estimulaci

. Y para el extracto de
 erleucina 1 beta en los
 ficativa($p>0.05$), en los



Equisetum giganteum



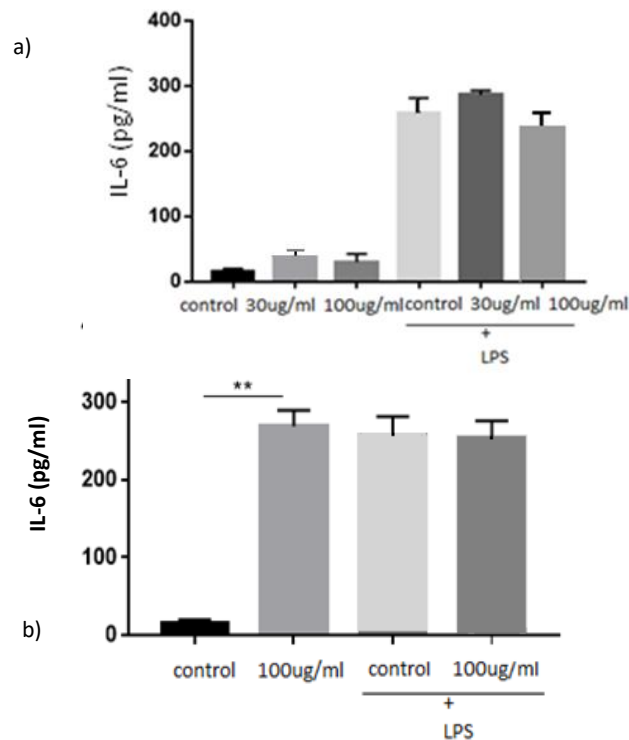
Croton lechery

c)

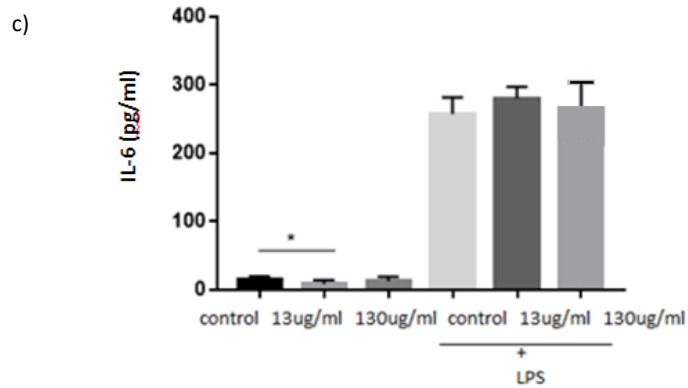
Erytroxylum coca

Figura 17 Evaluación de IL-1 β en células mononucleares en 24 horas de cultivo celular tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) y estimulación con Lipopolisacárido (LPS) como control positivo. La IL 1- β producida se expresó en pg/mL de 3 experimentos por triplicado \pm 1DS, la significancia estadística entre dosis respecto al control de células no tratadas fue * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En referencia a la liberación de interleucina 6, en la figura 18 se observa que con el extracto de *E. giganteum*(a) no existe una diferencia clara de estimulación o inhibición. Para el caso del extracto de *Croton lechleri* (b) se observa que existe una importante estimulación de la liberación de la interleucina (254 pg/mL respecto al control). Para el caso del extracto de *E. coca*(c) no existe una liberación o inhibición significativa estadísticamente tanto en los ensayos con estimulación con LPS, como los sin estimulación.



Croton lechleri



Erythroxyllum coca

Figura 18. Evaluación de interleucina 6 en células mononucleares en 24 horas de cultivo celular tratadas con los extractos h.a. de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erythroxyllum coca* (c) y estimulación con Lipopolisacárido (LPS) como control positivo. La IL-6 producida se expresa en pg/mL de 3 experimentos por triplicado \pm 1DS, la significancia estadística entre dosis respecto al control fue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En la figura 19 se observa que no existe respuesta de producción de interleucina 8 sin estimulación con LPS con ninguno de los 3 extractos; en los ensayos con estimulación con LPS se ve que a dosis bajas existe reducción de la estimulación que no es estadísticamente significativa en el caso de *E. giganteum* y en el caso de *E. coca*. Con *C. lechleri* no se observa estimulación ni inhibición.

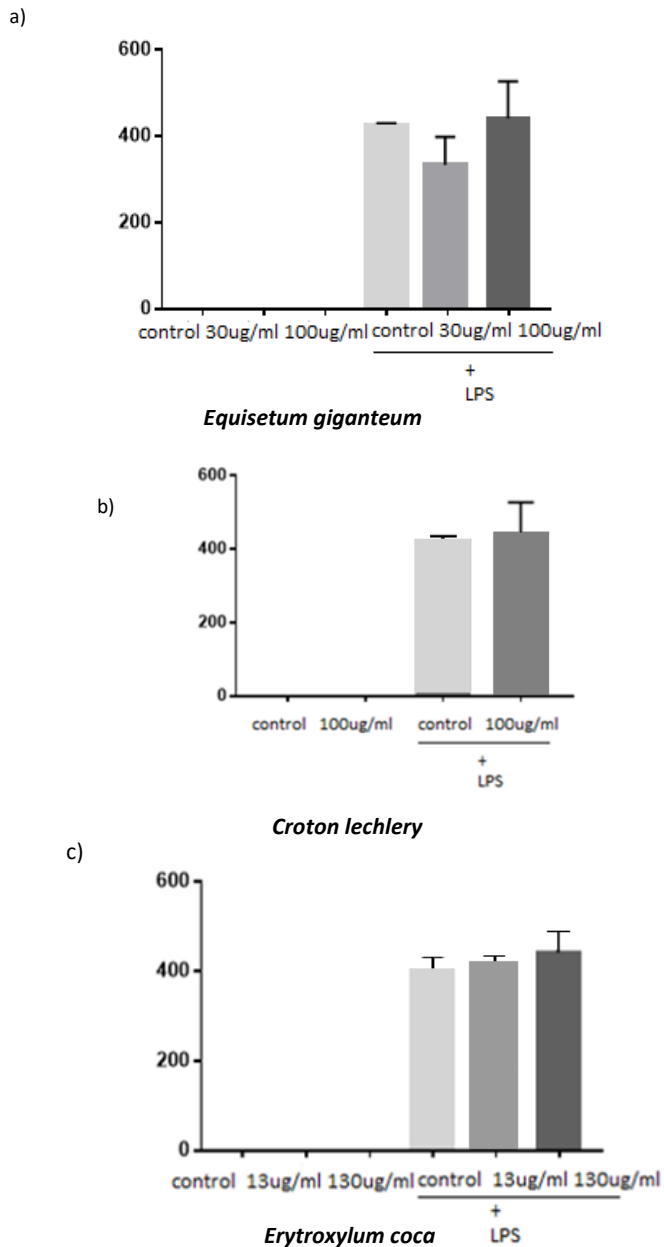
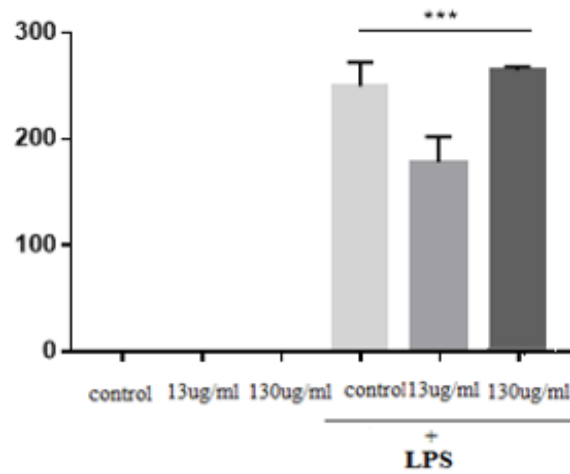


Figura 19. Evaluación de interleucina 8 en células mononucleares en 24 horas de cultivo celular tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erythroxylum coca* (c) y estimulación con Lipopolisacárido (LPS) como control positivo. La IL-8 producida se expresa en pg/mL de 3 experimentos por triplicado $\pm 1DS$

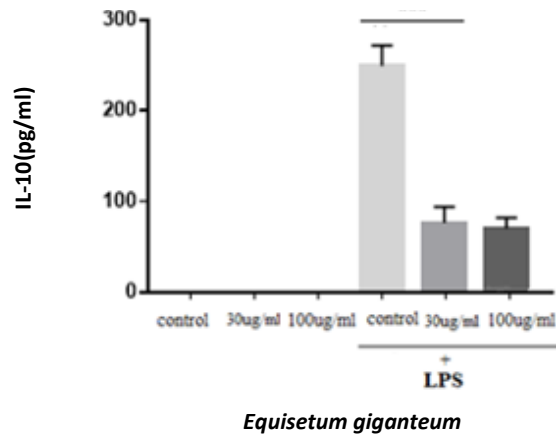
En el ensayo para determinar la liberación de IL-10 (Figura 20) se puede observar que en el caso de *E. giganteum* (a) existe una actividad inhibitoria de la liberación por el extracto se observa una inhibición alrededor de un 70% respecto al control estimulado con LPS y no así en los no estimulados. En el caso de *Croton lechleri* (b) se pudo observar que existe una

leve inducción de libera
 células con LPS se
 caso de *E. coca(c)s*
 de la liberación de
 estimulación de lipopoli
 con lipopolisacárido.

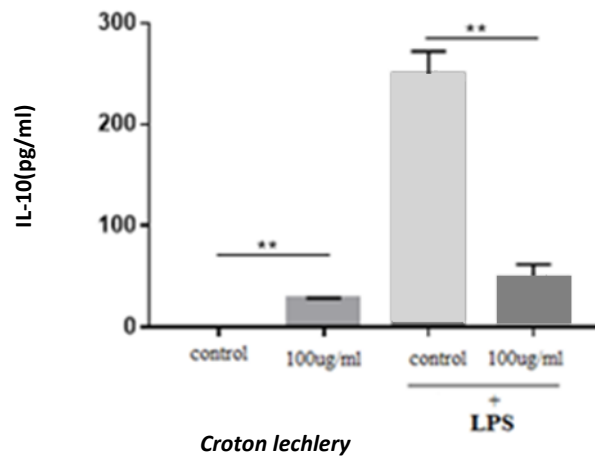


control). En las
 e un 75%. En el
 existe inhibición
 a de células con
 in estimulación

a)



b)



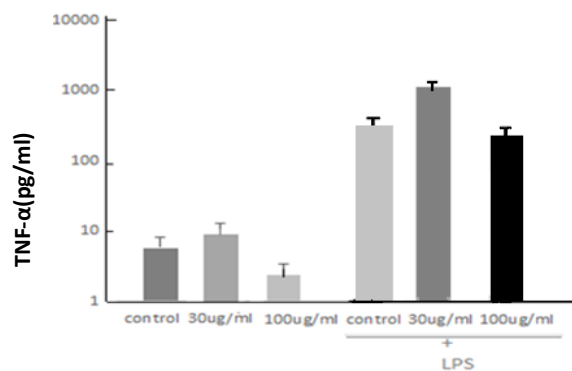
c)

Erytroxylum coca

Figura 20 Evaluación de interleucina 10 en células mononucleares en 24 horas de cultivo celular tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechery* (b) y *Erytroxylum coca* (c). Las células con estimulación con Lipopolisacarido (LPS) fueron consideradas como control positivo. Los datos expresan la concentración de la citoquina en pg/mL de 3 experimentos por triplicado \pm 1DS, la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

La liberación de TNF- α en presencia de los extractos estudiados se observa en la figura 21. Para el extracto de *E. giganteum*, en los cultivos sin LPS se aprecia una actividad dual ya que a dosis más bajas del extracto existe una estimulación de la liberación de TNF- α y a dosis más altas existe una inhibición, aunque ambos casos no son estadísticamente significativos con alta dispersión de datos en los diferentes ensayos. En el caso del extracto de *Croton lechery* se ve una estimulación significativa de la liberación de TNF- α en los cultivos con el extracto (529pg/mL respecto al control) y una leve inhibición en los ensayos en cultivos con estimulación con LPS que no es estadísticamente significativa. Y con *E. coca* se aprecia una leve pero significativa estimulación en los cultivos sin presencia de LPS (41 pg/mL respecto al control); en el caso de los ensayos con LPS el leve aumento de liberación no es estadísticamente significativo.

a)



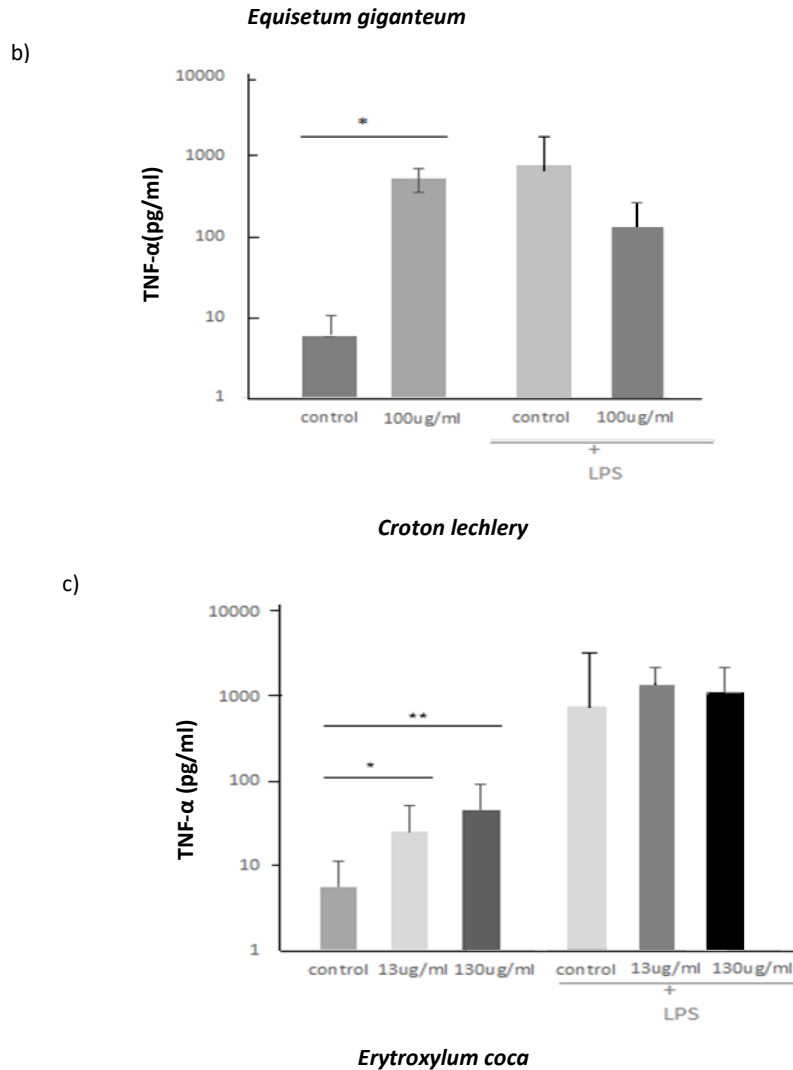


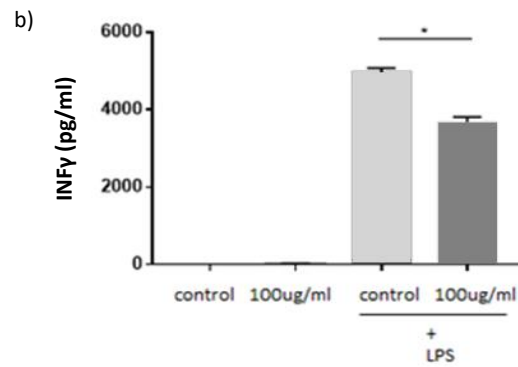
Figura 21. Evaluación de la liberación de TNF- α por células mononucleares en 24 horas de cultivo tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechery* (b) y *Erytroxylum coca* (c) y estimulación con Lipopolisacárido (LPS) como control positivo. El TNF- α producido se expresa en pg/mL obtenidos en 3 experimentos por triplicado ± 1 DS, la significancia estadística entre dosis respecto al control fue; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En la figura 22 se observa la respuesta en la producción de interferón gamma (INF- γ) con los extractos estudiados. En el caso de *E. giganteum* (a) y *C. lechery* (b) se observa una leve inhibición de la producción a la dosis más baja en los ensayos con LPS (alrededor de 35% con *E. giganteum* y 36% con *Croton l.* respecto al control); en los ensayos sin estimulación

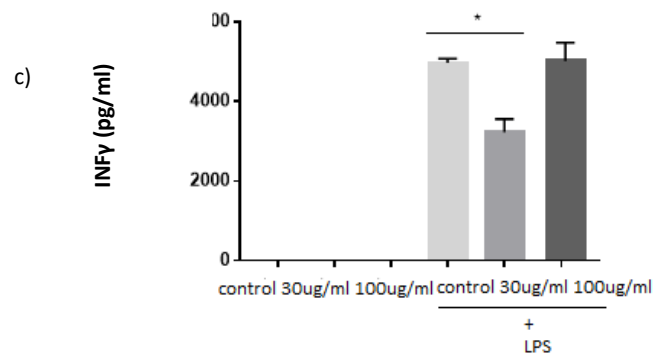
con LPS no se observan cambios estadísticamente significativos. En el caso de *E. coca*(c) se observa una leve inhibición de 15% respecto al control a la dosis más baja en los ensayos con estimulación de LPS; en los cultivos sin LPS no existe estimulación estadísticamente significativa.

a)

Equisetum giganteum L.



Croton lechleri



Erytroxylum coca

Figura 22. Evaluación de la liberación de interferón gamma en células mononucleares en 24 horas de cultivo tratadas con los extractos de *Equisetum giganteum* (a), *Croton lechleri* (b) y *Erytroxylum coca* (c) y estimulación con Lipopolisacárido(LPS) como control positivo. El Interferón producido se expresa en pg/mL obtenidos en 3 experimentos por triplicado \pm 1DS, la significancia estadística entre dosis respecto al control fue; * $p < 0.05$

EFEECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA VÍA DEL INFLAMASOMA.

Para evaluar la actividad de los extractos en la red de Inflamasoma tomamos en cuenta los extractos de las dos plantas con mayor actividad de IL-1 β previamente medida en cultivos celulares: *Equisetum giganteum* L, y *Croton lechleri* Müll.Arg. Para medir dicha actividad se cultivó células mononucleares y neutrófilos, y se incluyeron controles positivos (es decir, la nigericina y polydA: dT que activan los inflamasomas NLRP3 y AIM2 respectivamente). En la figura 23 se observa que a una concentración de 100 μ g/ml del extracto de *Equisetum giganteum* L se induce la liberación de IL-1 β en neutrófilos no cebados y no así en neutrófilos cebados con LPS (30ng/ml; en cambio, en células mononucleares se produce

una liberación de IL-1 β con 100 μ g/ml de *C. lechleri* en las células no cebadas y una elevada cantidad de esta citoquina con ambos extractos y dosis en los mononucleares cebados

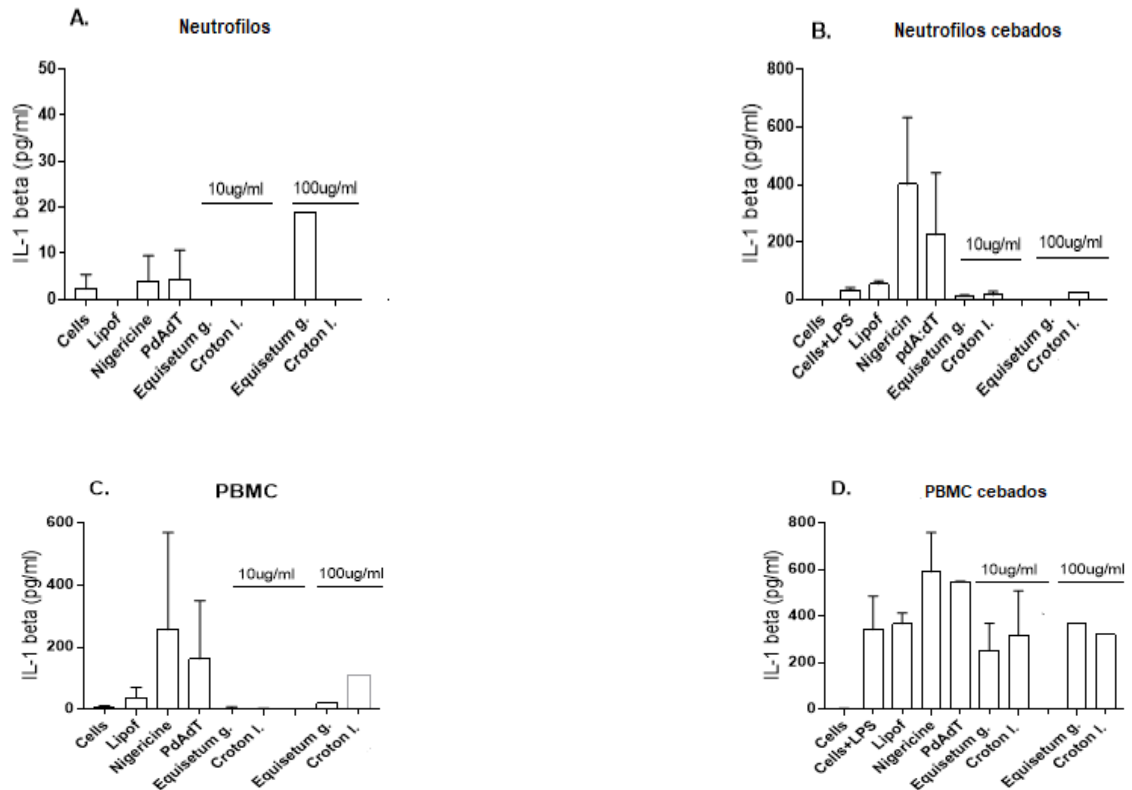


Figura 23 evaluación de la liberación de IL-1 β en los sobrenadantes recogidos tras 3 horas de incubación de las células expuestas al medio, a la lipofectamina, a la nigericina y al polydA:dT y a las diluciones de los extractos vegetales (A) Neutrófilos (B) Neutrófilos cebados, (C) Células PBMC (D) Células PBMC cebadas.

EFFECTO EN LA ACTIVACION DE INFLAMASOMA NLRP3 Y AIM2

Ante la posibilidad de que los extractos estudiados tengan actividad antiinflamatoria se diseñó el experimento para analizar si pueden inhibir o bloquear la activación del Inflamasoma en los neutrófilos o PBMC, para esto las células fueron estimuladas con 10 μ g/ml de polydA:dT (pdA:dT) para la activación de AIM-2, y 10 μ M de Nigericina para la activación de NLRP3. La evaluación también se realizó después de cebar con 30ng/ml de LPS. En la figura 24 se observa el pretratamiento de las células con extractos de las plantas estudiadas (10 μ g/ml) una hora antes del cebado y estimulación con polydA:dT el cual

mostró una reducción tanto de los niveles de IL-1 β (Fig. 24A), como de la liberación de LDH (Fig. 24B) y de la expresión de AIM2 (Fig. 24C). La reducción no fue similar con la estimulación con Nigericina para la activación de NLRP3: *E. giganteum* no inhibió al inflamasoma en la producción de IL-1 β (Fig. 24D); la liberación de LDH (Fig. 24E) y expresión de NLRP3 (Fig. 24F) fueron bastante parecidas

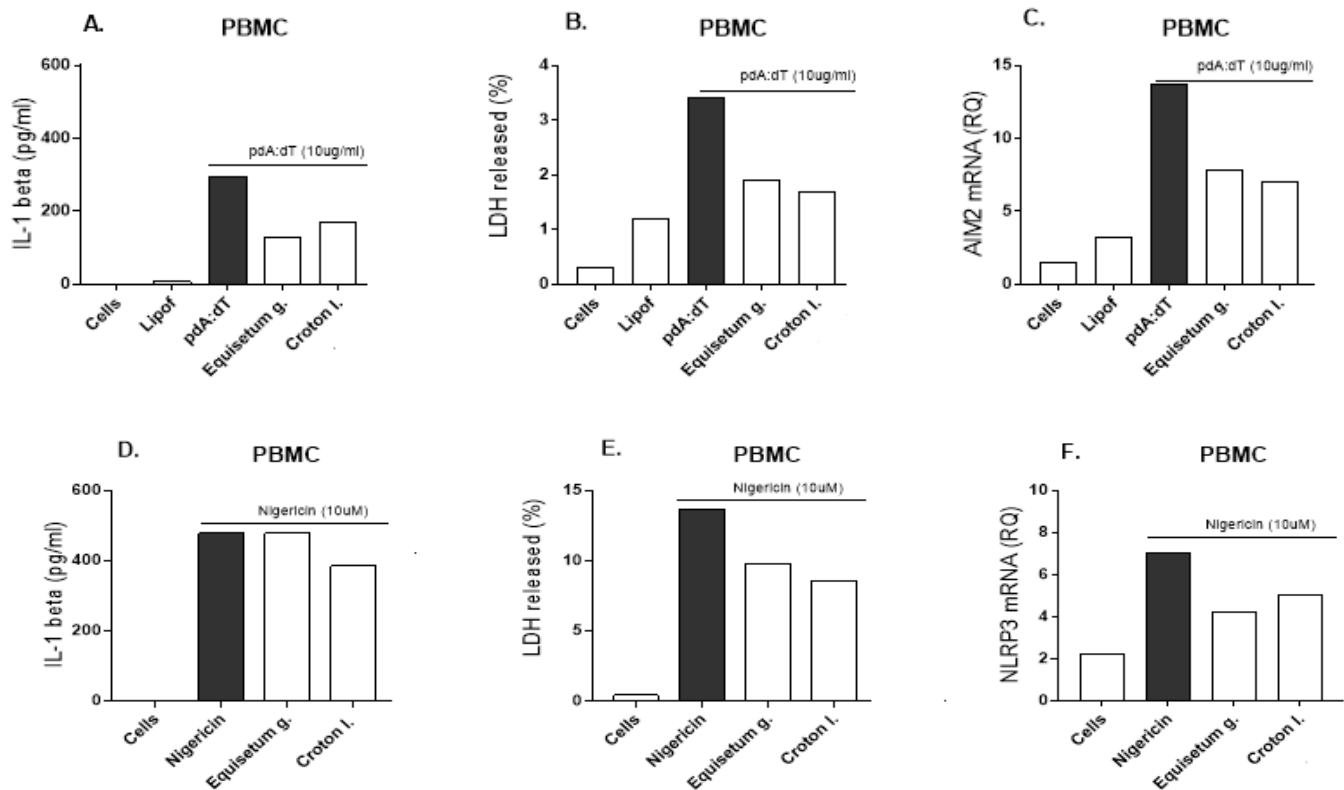


Figura 24. evaluación a través de la secreción de IL-1 β , la liberación de LDH y la expresión de la activación del inflamasoma AIM2 y NLRP3 in vitro en células PBMC. La liberación de IL-1 β , LDH y la cuantificación relativa de los complejos se midieron en los sobrenadantes recogidos después de, una hora de pretratamiento con extractos de las plantas, y 3 horas de incubación de las células expuestas a polydA:dT (A-C) y la estimulación con Nigericina (D-F) donde se observa que no existió significancia estadística.

Para evaluar si en neutrófilos se puede inhibir la activación del inflamasoma, se realizó un pretratamiento de las células con los extractos de las plantas de nuestro estudio (concentración de 10 μ g/ml) una hora antes de cebarlas con LPS (30 μ g/ml) y estimularlas con polydA:dT o Nigericina. Se observó una leve inhibición de la producción de IL-1 β (Fig.

25 A) y de liberación de LDH (Fig. 25 B) en células cebadas y estimuladas con polydA:dT con ambos extractos, en cambio se observó un aumento en la expresión de AIM-2 (medida a través de la expresión de ARNm) respecto al control (Fig. 25, C). Cuando se utilizó Nigericina (10uM) después del cebado, no hubo inhibición de la activación de NLRP3, al contrario, los niveles de IL-1 β y la liberación de LDH fueron altos (Fig. 25D-E); no se mostraron resultados significativos en la expresión de NLRP3 en neutrófilos (datos no mostrados).

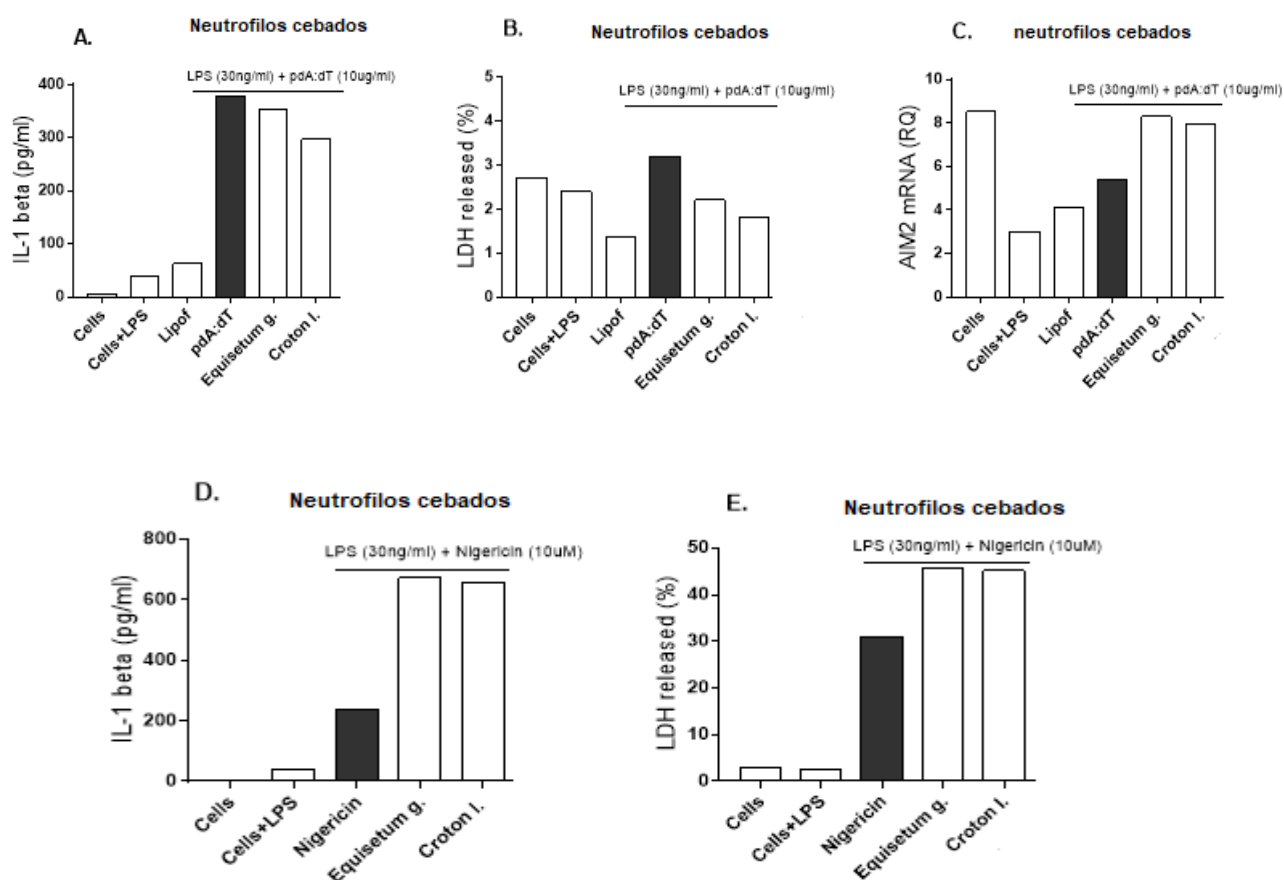


Figura 25. Evaluación a través de la liberación de IL-18, LDH y la cuantificación relativa de los complejos en los sobrenadantes recogidos tras, una hora de pretratamiento con extractos de plantas, 3 horas de cebado con LPS, y 3 horas de incubación de neutrófilos expuestos a polydA:dT (A-C) y estimulación con Nigericina (D-E).

Para evaluar si los extractos de nuestro estudio pueden inhibir o bloquear la activación del inflammasoma NLRP3 mediante la inhibición de la actividad de Caspasa 1, los neutrófilos y las células PBMC se pre-trataron con extractos de plantas durante una hora y, tras la estimulación con 10 μ M de Nigericina para la activación del NLRP3, se realizó un análisis en el citómetro de flujo a través de la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) con tinción FAM-FLICA durante una hora. Como se observa en la Fig. 26 (Fig. 26 A control de tinción, Fig. 26 B control de Nigericina sola), la inhibición de la activación de la Caspasa 1 con *Equisetum giganteum* fue del 50% (Fig. 26 C) y con *Croton / Müll.Arg.* alrededor del 30% (Fig. 26 D) en comparación con el control positivo Nigericina. Aunque también evaluamos los neutrófilos, no observamos diferencias respecto a los controles.

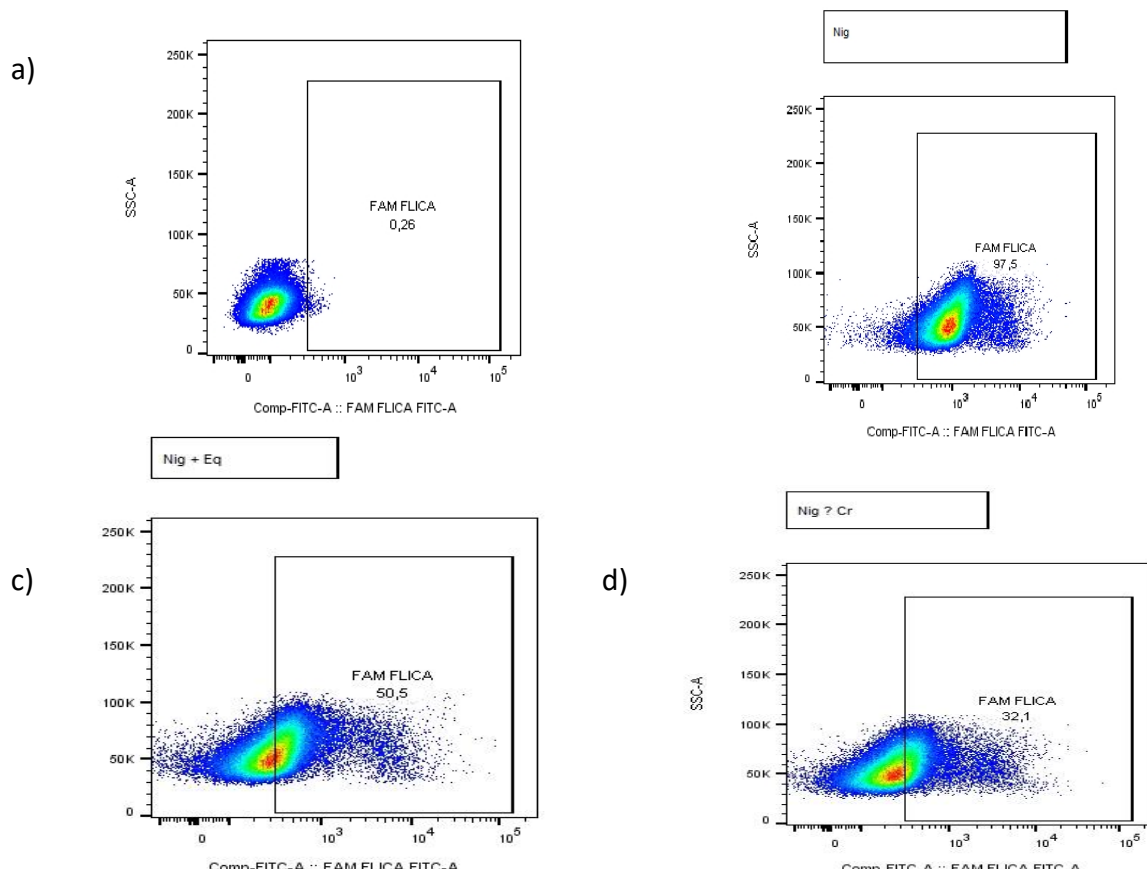
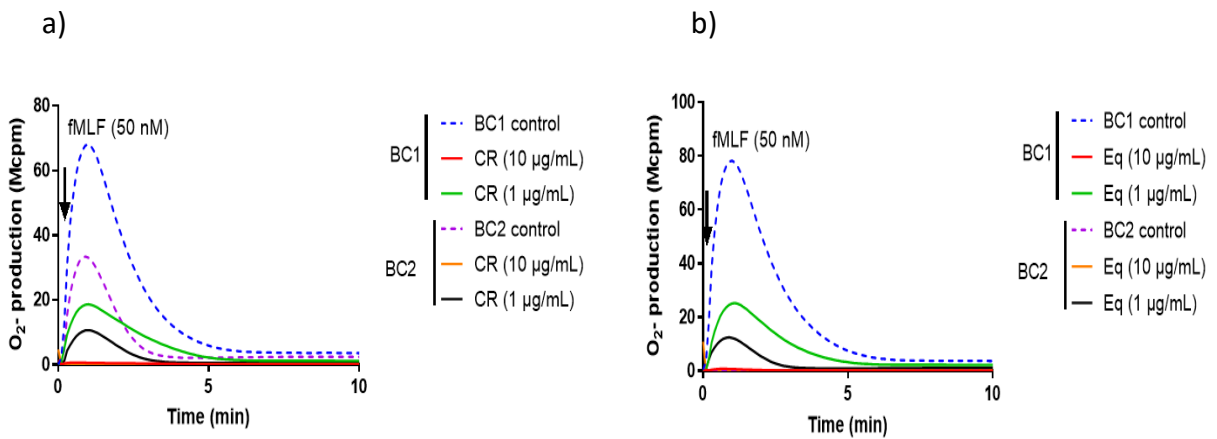


Figura 26 Evaluación de la inhibición de la actividad de Caspasa 1 26 A) control de tinción, Fig. 26 B control de Nigericina sola), la inhibición de la activación de la Caspasa 1 con *Equisetum giganteum* fue de alrededor del 50% (Fig. 26 C) y con *Croton Müll.Arg.* alrededor del 30% (Fig. 26 D)

PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO ASOCIADOS A INFLAMASOMA

Para evaluar si los extractos de nuestro estudio pueden bloquear la producción de ROS y a través de esta influir en la activación o bloqueo del Inflamasoma se evaluó la producción de ROS extracelular mediante isoluminol (no permeable a las células) y la adición del estimulante fMLP.

Como se observa en la Fig. 27, la concentración de 10µg/ml de *Croton lechery Müll.Arg* y *Equisetum giganteum* producen inhibición de ROS inducida por fMLP en niveles significativos (Fig. 27A-27B).



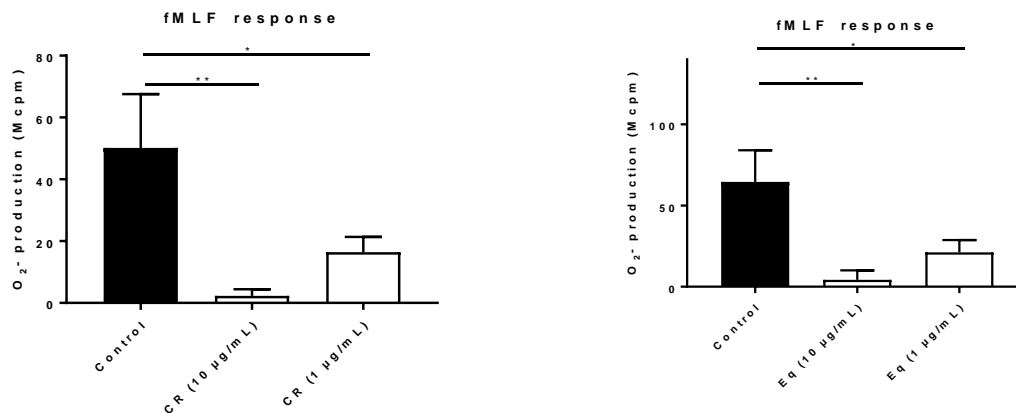


Figura 27 Inhibición de las ROS extracelulares inducidas por el fMLP con los extractos. La producción/liberación de aniones superóxido por parte de los neutrófilos se midió con un sistema de quimioluminiscencia amplificada con isoluminol/HRP y los resultados se expresan en cpm. (cuentas por minuto). Los neutrófilos se incubaron durante 5 minutos a 37 °C antes de añadir el péptido fMLP y los extractos de plantas. (media±SD, n=2); BC= buffy coat CR= Croton lechery Müll.Arg, Eq= Equisetum giganteum; *p < 0,05, **p < 0,01,

Actividad extracelular de la NADPH-oxidasa inducida por la PMA

Para estudiar si la inhibición de la producción de superóxido aniónico no depende únicamente del receptor FPR1, se realizó la medición de la quimioluminiscencia generada por el estimulante PMA (forbol miristato acetato). Para esto las células fueron incubadas con el estimulante y el extracto, así como sólo con el estimulante para diferenciar la producción de superóxido aniónico. El control utilizado fue sólo el medio de cultivo.

A la concentración de 10µg/ml y 1ug/ml *Croton lechery Müll.Arg* y *Equisetum giganteum* provocan la disminución de la producción extracelular de anión superóxido por estimulación de PMA (Fig. 28 A y B).

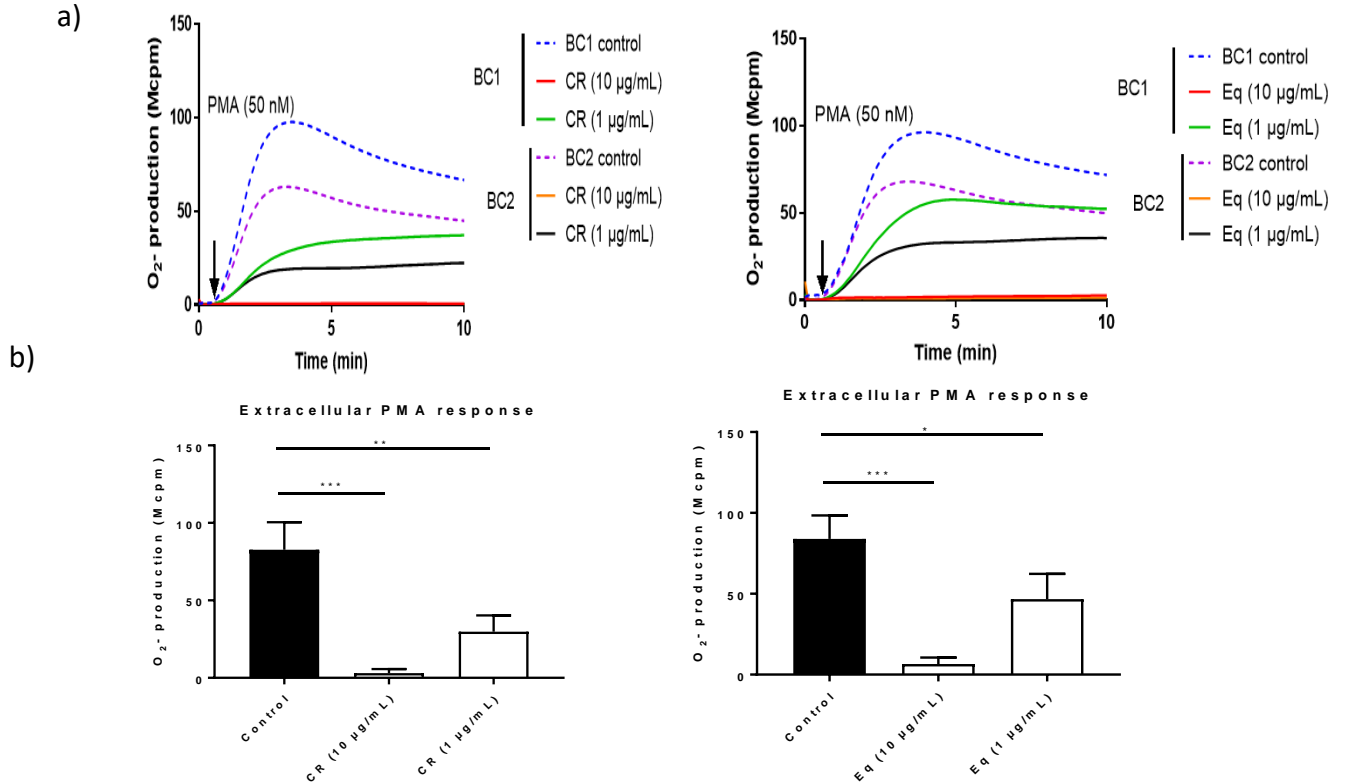


Figura 28. La producción/liberación de aniones superóxido por parte de los neutrófilos se midió con un sistema de quimioluminiscencia amplificada con isoluminol/HRP. Los neutrófilos se incubaron durante 5 minutos a 37 °C antes de la adición de PMA; y los extractos de plantas. Se expresan los resultados en cpm (cuentas por minuto) (media±SD, n=2); BC= buffy coat CR= *Croton lechery Müll.Arg*, Eq= *Equisetum giganteum*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Inhibición intracelular de ROS

Para evaluar la inhibición intracelular del anión superóxido por los extractos de plantas, se realizó el ensayo de quimioluminiscencia con luminol en presencia del estimulante PMA. Las células se incubaron con el estimulante, la SOD, la catalasa y los extractos de plantas, así como sólo con el estimulante para diferenciar la producción del anión superóxido. El control utilizado fue sólo el medio con el estimulante. Se observa en la Fig. 29 que a la concentración de 10µg/ml *Croton lechery Müll.Arg* y *Equisetum giganteum* inducen la

disminución de la producción intracelular de anión superóxido por estimulación de PMA con luminol.

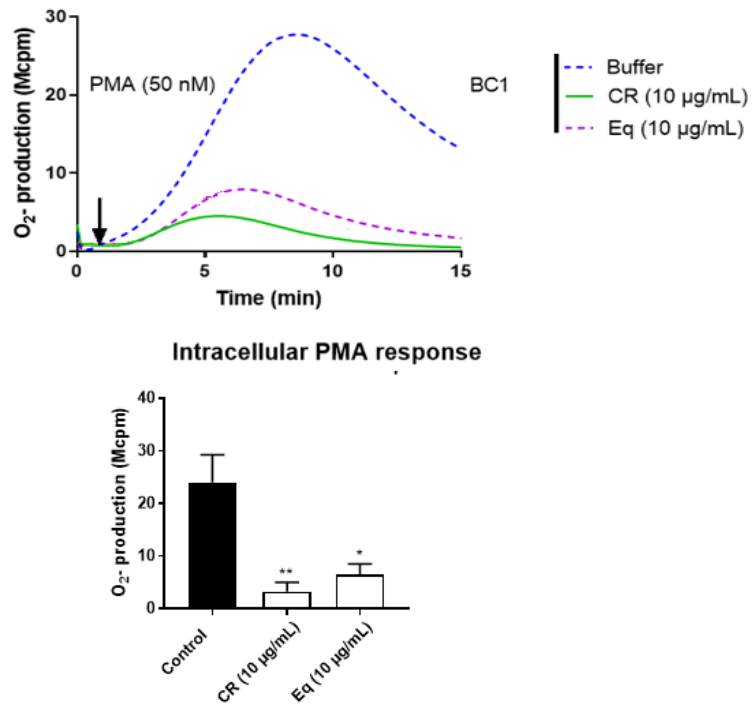


Figura 29. La producción/liberación de aniones superóxido por parte de los neutrófilos se midió con un sistema de quimioluminiscencia amplificada luminol/SOD/catalasa. Los neutrófilos (1×10^6 células/ml) se incubaron durante 5 minutos a 37°C antes de añadir PMA; 5×10^{-8} M y los extractos de plantas. Los resultados se expresan en cuentas por minuto. (media \pm SD, n=1), CR= *Croton lechery Müll.Arg*, Eq= *Equisetum giganteum*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

9. DISCUSION

El estudio de las plantas medicinales en la actualidad se lleva a cabo con el objeto de encontrar nuevos recursos terapéuticos o preventivos tanto para las patologías prevalentes como para las emergentes. El procedimiento clásico para la evaluación y estudio de plantas con potencial medicinal consiste en evaluar la existencia de actividades biológicas de sus componentes, obtenidos en extractos y, a partir de esto, en caso de encontrar actividad promisoriosa se analizarán los metabolitos y principios activos solos o en conjunto para formular nuevos productos con actividad farmacológica. A través de la historia, el hombre ha buscado nuevas fuentes terapéuticas para la resolución de las distintas enfermedades (infecciosas, parasitarias, metabólicas, neoplásicas, degenerativas, cardiovasculares, autoinmunes), pero el perfil epidemiológico (principalmente de las infecciosas) ha variado en el tiempo por lo que, se ha incrementado la búsqueda de nuevos principios activos de productos naturales que contribuyan a la resolución de dichos problemas, gran parte de los cuales están mediados por procesos inflamatorios crónicos.

Dado que muchas veces existen efectos contrarios a los deseados provocados por algunos fármacos de origen químico en afectación del sistema inmune, se ve la necesidad de estudiar y acudir a otras fuentes como ser los productos naturales. Esto cobra sentido en Bolivia ya que cuenta con una gran diversidad en productos naturales utilizados de forma terapéutica, por diferentes etnias las cuales además han acumulado conocimiento sobre su uso y manejo (Ministerio de Salud, 2016). Por esto, en este estudio se seleccionó a *Equisetum giganteum L.*, *Crotón lechleri* y *Erythroxylum coca*, plantas de amplio uso en la medicina tradicional de la etnia Tacana, donde se desarrolló la colecta y se recibió el

conocimiento ancestral sobre su uso para enfermedades virales, infecciosas e inflamatorias en el proyecto sobre la identificación de plantas amazónicas. (Terrazas K. y Carvajal R. 2021).

En estas plantas se ha buscado evaluar su efecto inmunomodulador por la amplia relación de las patologías en las que se usa dichas plantas con el sistema inmune y con todos los sistemas relacionados.

Con la finalidad de reducir el uso experimental de animales y de humanos, de acuerdo a las últimas normas de bioética, una forma de poder trasladar el efecto sobre el organismo es usando los modelos de cultivo in vitro. Estos se han ido utilizando cada vez más ampliamente desde los estudios e implementación de las vacunas, particularmente los cultivos de células de mamíferos o directamente de células humanas. Si bien el resultado observado sobre las células no es una réplica exacta del efecto sobre el organismo ya que este es más complejo, se obtiene una idea consistente de los efectos de los productos naturales que podrían resultar en el organismo humano.

En este estudio se utilizaron cultivos primarios de células aisladas de sangre periférica humana, específicamente leucocitos, los cuales son las células principales de respuesta de la Inmunidad Innata. Se usaron estas células por su facilidad de manejo y la posibilidad de explorar su funcionalidad en sistemas in vitro. Se estableció la necesidad de caracterizar el estado de salud de los donantes, para evitar respuestas inconsistentes causadas por cambios en la biología del sujeto.

Las dosis a las que se utilizaron los extractos de las plantas fueron definidas por la información del uso tradicional y por los antecedentes de estudios previos realizados en

nuestro laboratorio, donde se demostró la actividad antiviral para el caso de *Equisetum giganteum* L. y *Croton lechlery* Müll.Arg (Churqui y Cols., 2018). Para el caso de *Erytroxylum coca* las dosis a las que se utilizó del extracto fueron calculadas con base en la equivalencia, a 3 gramos de harina de coca consumida por el ser humano según las indicaciones de la medicina tradicional para usos terapéuticos diversos (Carvajal y Cols, 2018).

En inicio se evaluó el potencial efecto citotóxico de los productos en estudio mediante ensayos de viabilidad de las células mononucleares y polimorfonucleares en diferentes dosis e intervalos de tiempo. Esto en el supuesto de que si existiera una toxicidad alta de los productos (a las dosis seleccionadas) no se podría continuar con los estudios de funcionalidad celular.

Los resultados muestran que en cultivos de células mononucleares y polimorfonucleares con una concentración celular de 1×10^5 células/100 μ l de medio se logra un mantenimiento de viabilidad celular, hasta un 80% con 10 μ g/ml y 100 μ g/ml en *Equisetum giganteum* y *Croton lechlery* Müll.Arg y en el caso de *Erytroxylum coca*, se mantiene una viabilidad en el orden de 75 a 80% hasta la dosis de 1300 μ g/ml. Las dosis mayores de 1300 μ g/ml y las siguientes, concentradas en múltiplos de 10, afectan la viabilidad de una manera leve y evidente. A las dosis 100 veces mayor a la equivalente de consumo tradicional, se observa una toxicidad evidente.

Respecto al tiempo de exposición, se determinó que 48 horas es un tiempo adecuado y óptimo para determinar la toxicidad, ya que en periodos de tiempo menores se puede asumir que no exista un tiempo de contacto suficiente de las células con el producto; no se

examinó la toxicidad en periodos mayores a 48 horas ya que la vida media de las células se reduce aún en ausencia de extracto (cultivo primario), dado que son aisladas de sangre periférica y la sobrevivencia *in vitro* se reduce drásticamente en ese tiempo (como lo muestra los controles), como efecto de la carencia de nutrientes por el consumo del medio además de que muchas células desde que son colectadas son más lábiles por haber pasado su tiempo de vida media.

Todo lo anterior permitió definir la dosis de los extractos a las que las células mantienen su viabilidad en cultivo, dosis en las que se puede hacer los ensayos de actividad biológica sin inconvenientes en la funcionalidad celular.

Independientemente de lo anterior, se consideró importante conocer si los productos afectan la actividad o funcionalidad de las células. Una manera de conocer esto consiste en evaluar la capacidad de las células para reducir la sal de tetrazolio (Thiazolil Tetrazolium Bromide o MTT), un agente químico que se colorea al capturar electrones. Los resultados muestran que los extractos de *Equisetum giganteum* y *Crotón lechleri* a las dosis no tóxicas no afectan de forma significativa esta actividad de las células. Para el caso de *Erythroxylum coca*, a las dosis no tóxicas, no solamente no afecta esta actividad, sino que aparentemente la promueve a las dosis intermedias. Esto es compatible con la idea que no hay afectación de una de las actividades propias de los leucocitos en su función de eliminar microorganismos a través del estallido respiratorio, que ocurre como efecto de la activación de enzimas capaces de generar agentes súper-oxidantes que dañan la membrana microbiana. El incremento de esta actividad de activación de óxido-reductasas en el caso de *E. coca* pudiera tener relación con el hecho de que este producto es consumido para

aumentar la capacidad de consumo de oxígeno en el organismo y con esto la resistencia a la fatiga y el aumento de la fortaleza física temporal (Biondich, 2015).

Si bien un producto puede no alterar la estructura, la viabilidad celular y la principal actividad enzimática mitocondrial citoplasmática, existe la posibilidad de que modifique otros aspectos de su funcionalidad. En ese sentido, en este trabajo se desarrollaron protocolos para evaluar si estos productos son capaces de alterar el funcionamiento de los leucocitos en su actividad principal que es la mediación de la inmunidad innata.

Capacidad endocítica de células mononucleares y polimorfonucleares

En la evaluación de la capacidad endocítica (parte de la actividad fagocítica) de células mononucleares y polimorfonucleares se utilizó levaduras de *Sacharomyces cerevisiae* por ser de fácil manejo y observación al evaluar la endocitosis. Se observó que en el caso de células mononucleares incubadas con *E. giganteum* no hubo cambios significativos a las dosis no tóxicas para las células; solo se observó un leve descenso a la dosis de 100 µg, pero no significativo estadísticamente. Dado que el extracto crudo es un conjunto de compuestos activos con diferentes naturalezas químicas (carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos, cetonas) (Churqui y cols, 2018) se puede esperar que alguno de ellos puede estar modulando esta actividad celular; esto es coherente con lo encontrado en las células polimorfonucleares donde la función fagocítica se ve favorecida a la dosis de 30µg/ml ya que se observa un aumento significativo respecto a las células control sin tratamiento. Este hecho está en línea con la naturaleza metabólica de las células polimorfonucleares la cual es más compleja que de las células mononucleares, ya que son células con un

funcionamiento basado en un alto consumo metabólico por lo que, se propone que el favorecimiento de esta función se pueda deber a que alguno de los principios activos (los de mayor actividad que son los flavonoides) esté generando una mayor actividad celular al promover un aumento de consumo de energía en la célula y haciendo que sea más activa en fagocitar.

En el caso de *C. lechery* en contraposición a lo que se evidencio previamente en el estudio elaborado por Risco y Cols., (2003), donde vieron que el látex de sangre de grado promueve la fagocitosis en dosis bajas, en nuestro caso se pudo observar que en células mononucleares existe el descenso de la capacidad fagocítica a la concentración de 100µg. Siendo esta una concentración no toxica se puede inferir que de alguna manera está siendo afectada la capacidad fagocítica de las células hecho que podría asociarse a la elevada cantidad de alcaloides y terpenos presentes en el extracto (Churqui, 2017) que pudieran inhibir el reconocimiento fagocitario a través de receptores por parte de las células, o la capacidad de formar los fagosomas. Es atractiva la idea de indagar esta posible función para explicar el uso de esta especie en patologías asociadas a la inflamación. En el caso de las células polimorfo-nucleares no se pudo evidenciar un cambio significativo en esta función con este extracto.

Para *E. coca* se observó que este producto aumenta la capacidad fagocítica tanto en células mononucleares como en células polimorfo-nucleares. Dado que es un extracto con múltiples alcaloides (Churqui, 2017) se puede asociar este hecho al efecto de *E. coca* para promover el aumento del consumo de oxígeno reportado compatible a lo encontrado con MTT. Este posible incremento en la producción de energía podría relacionarse con el

incremento de la capacidad fagocítica de las células a través de la activación mayor de la actina para formar pseudopodos e ingerir a las partículas extrañas. Además, existen muchos reportes que la coca también promueve a un aumento en el metabolismo de la glucosa Casikar, Mujica y Cols.(2010)lo cual también podría ligarse al aumento de la capacidad fagocitaria, actividad que está asociada al consumo de energía.

Quimiotaxis de células polimorfonucleares

Existen diferentes estímulos quimioattractantes para las células fagocíticas, dentro de los más potentes se encuentran los péptidos formilados; en nuestro estudio utilizamos el péptido N-fMLP conocido como potente quimioattractante sintético que mimetiza a los compuestos que liberan las bacterias (Thomas, Kleist y Cols. 2018). En nuestros resultados se observó que en el caso del extracto de *E. giganteum* y *Croton lechlery Müll.Arg* no existe una modificación significativa en esta función en las células expuestas a los extractos, con respecto a las células control no tratadas, en las dosis no tóxicas, esto pone en evidencia que ninguno de los componentes de los extractos estaría interfiriendo con la migración celular.

Para el caso de *E. coca* se observó que existe un aumento significativo de la capacidad migratoria celular hacia el péptido formilado en presencia del extracto, en la concentración no tóxica de 130µg/ml e incluso a dosis un poco más alta de 1300µg/ml. Puede suponerse que este efecto es producido por alguno de los componentes activos de *E. coca* ya sea actuando sobre los receptores N-formyl presentes en las células, haciendo que estos

aumenten en número y en afinidad, o respondiendo a estímulos metabólicos, hecho que a la larga favorecería en gran forma la eficacia de la respuesta inmunitaria.

Capacidad microbicida de células mononucleares y polimorfonucleares

Una vez que un microorganismo ha sido ingerido mediante la endocitosis, se acompaña a esta una serie de eventos oxidativos que se expresan en el incremento en: a) el consumo de oxígeno b) consumo de glucosa c) la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato d) producción de peróxido de hidrógeno y otros peróxidos. El conjunto de estos cambios se denomina estallido respiratorio que es la base de la capacidad microbicida de las células. En la evaluación del extracto de *Equisetum giganteum* se observó un aumento de la capacidad de digestión y destrucción de *Estafilococo aureus* ingerido por células mononucleares y polimorfonucleares a las dosis de 10µg/ml y 30µg/ml a los 60 minutos de incubación de las células con el extracto en contacto con el microorganismo, previo tratamiento. No se vio este aumento a los 10 ni a los 30 minutos de contacto. Este incremento en la función de digestión y destrucción podría deberse a la influencia de los componentes de la planta sobre los microorganismos, potencialmente flavonoides, ya que se observó que estos cuando actúan directamente sobre los microorganismos en su capacidad antimicrobiana son capaces de inactivar la adhesión microbiana y promover a la ruptura de la membrana bacteriana (Alvarce y Cols., 2015). Por otro lado, no se debe excluir la posibilidad de que el extracto actúa sobre la célula estimulando la capacidad de degranulación oxidativa, haciendo que de esta manera se favorezca la digestión y muerte de los microorganismos.

En el caso del extracto de *C. lechery* se observó un aumento de la capacidad microbicida en células polimorfonucleares a la dosis de 30µg/ml en 60 minutos de contacto con el microorganismo pero no se observó este aumento en células mononucleares, en las que solo se pudo observar que no existió un descenso o una anulación de esta función en las células por parte del extracto, en las dosis no tóxicas.

En el caso del extracto de *E. coca* se observó que no existió una anulación o disminución de la capacidad de digestión y muerte de microorganismos, ni se observó incremento significativo de esta función. Esto podría interpretarse como la inexistencia de una relación entre el incremento del consumo de O² inducido por la coca y el estallido respiratorio.

Producción de citoquinas en células mononucleares

La actividad inmunomoduladora de estos extractos se examinó *in vitro* determinando la producción de citoquinas anti o pro-inflamatorias a través de la medición de sus concentraciones en los sobrenadantes en los cultivos celulares a los que se adicionó los extractos. Se midió esta producción de manera directa sobre las células que previamente fueron estimuladas por LPS para sensibilizarlas con este proceso.

Producción de IL-1β

La interleucina 1β es una citoquina proinflamatoria con múltiples funciones en la respuesta inmune en casos de daño celular y de infecciones, favorece el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección, amplifica la respuesta de linfocitos T y B, y puede inducir también la producción de IL-6.

En nuestros resultados observamos que para el caso de *E. giganteum* se observó que en las células sin inducción con LPS a la dosis de 100µg/ml existe un aumento de la producción de esta citoquina. Este aumento permite pensar que existen en el extracto de *E. giganteum* componentes que ejercen una actividad inmunoestimulante directa que puede darse a nivel de la activación a través de inflammasoma, lo que estaría en línea con un estudio paralelo que examina la respuesta a este extracto sobre la expresión de proteínas de inflammasoma y actividad de caspasas (Churqui, 2020). En el caso de las células preactivadas con LPS; no existió una producción significativa de esta citoquina.

El extracto de *C. lechlery* mostró una alta capacidad para inducir la producción o liberación de esta citoquina a la dosis de 100µg/ml en células sin inducción con LPS. Dada la diversidad de compuestos en este extracto se puede plantear que alguno(s) componentes pueden, ya sea por medio de una señal de daño (DAMPS) o quizás también por unión a receptores, promover la producción o liberación de esta citoquina generando el efecto proinflamatorio que parece tener esta planta.

En la respuesta al extracto de *E. coca* no existió una actividad inductora en la producción de esta citoquina que fuera estadísticamente significativa, tanto en células estimuladas como en las no estimuladas con LPS, mostrándose que este extracto no parece actuar sobre la estimulación de esta citoquina.

Producción de IL-6

La interleucina 6 es una citosina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. En la actualidad se la reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda; también posee efectos antiinflamatorios al ejercer un control

parcial sobre la producción de IL-1 β y TNF- α . A diferencia de la IL-1 y el TNF- α , que poseen acciones proinflamatorias, los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citosinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Murakami, Kamimura y Cols. 2019).

En nuestros resultados se observó que con el extracto de *E. giganteum L.* existió una estimulación leve de su liberación a dosis bajas en células sin LPS; esto podría ser la consecuencia de la estimulación que existe de liberación IL-1 β con esta planta, teniendo en cuenta las regulaciones comunes de ambas interleucinas en su papel pro-inflamatorio.

En el caso de *Croton lechery Müll.Arg* se observó que a la dosis de 100 μ g/ml en células sin inducción con LPS existe una respuesta de producción de esta citoquina. Esto permite proponer que en el marco de la complejidad de la respuesta inflamatoria y de la numerosa composición del extracto estos componentes tengan similitud estructural con lipopéptidos o con LPS que conllevan a la actividad de producción de esta citoquina dando lugar a que actúe como un agente proinflamatorio,

En el caso del extracto de *E. coca* no existe una clara significancia estadística de inhibición o estimulación de la producción de esta citoquina. Se pudo observar que en las células sin inducción de LPS el extracto en muy baja concentración estimula la producción y en las

células estimuladas con LPS existe aparente inhibición que no tiene significancia estadística. Lo anterior da lugar a la importancia de explorar a profundidad esta aparente inconsistencia, si se quiere contar con un nuevo agente terapéutico basado en este vegetal.

Producción de IL-8

En nuestros resultados observamos que no existe una estimulación o inhibición de esta citoquina por parte de los extractos (*E. giganteum* L, *Croton lechleri* Müll.Arg y *E. coca*) ya que no se ve una diferencia significativa con respecto a los controles. Estos extractos no estarían interfiriendo en las vías de producción o inhibición de esta citoquina.

Producción de IL-10

En nuestros resultados se observó que en el caso del extracto de *E. giganteum* existe una evidente actividad inhibitoria de la liberación de esta citoquina antiinflamatoria a las dosis ensayadas. Esta actividad podría ser de algún componente del extracto sobre las rutas de señalización o de activación. En los resultados obtenidos para *C. lechleri* se observó una respuesta de estimulación e inhibición a diferentes dosis tanto en células pre-activadas con LPS como en no activadas, por lo que se podría proponer que es posible que por sí mismo algunos de los componentes del extracto actúen a través de una retroalimentación negativa para prevenir los efectos que se generan en las células después de la instalación de la inflamación. Y en el caso de la respuesta en células pre-activadas con LPS podría darse una regulación de la inhibición de esta citoquina por el aumento de las citoquinas proinflamatorias. En el caso del extracto de *E. coca* en las células tratadas con la planta sin estimulación de Lipopolisacárido no se observa una producción de esta citoquina, sin embargo, en las células tratadas con el extracto y estimuladas con lipopolisacárido se ve

una significativa disminución en su producción en la dosis de 13µg/ml. Esto lleva a pensar que este extracto a través de alguno de sus múltiples componentes, a esta dosis, podría actuar de forma directa o través de la regulación de las otras citoquinas pro inflamatorias.

Producción de TNF-α

TNF-α es una citoquina secretada en respuesta a estímulos inflamatorios y de apoptosis, su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como IL-1β Promueve la inflamación, activación endotelial, inducción de fiebre, y activación de proteínas de fase aguda.

En nuestros resultados se observó que en el caso de *E. giganteum L.* se observó a la concentración de 100µg/ml una importante estimulación de esta citoquina en células pre-activadas. Esto parece correlacionar con la demostrada actividad antiviral de esta planta (Churqui, 2018), la misma que reforzaría el papel farmacológico en las virosis en las que se debe generar una cadena de respuestas pro inflamatorias para la posterior eliminación del agente viral.

En el caso *C. lechery* se observó que, siendo un extracto crudo compuesto por numerosos componentes estos estimulan la producción de esta citoquina promoviendo una regulación positiva hacia un efecto pro-inflamatorio. Esta actividad podría también relacionarse a su actividad antiviral (Ubillas,Jolad,1994). En las células estimuladas con LPS se aprecia una inhibición esto podría deberse a que si bien Croton l. estimula la liberación de esta citoquina sin LPS con LPS tiene un efecto contrario de interferencia en la actividad de LPS que, aunque no es de gran magnitud, esta contradicción debería resolverse investigando más el papel de LPS sobre esta citoquina.

Por su parte el extracto de *E. coca* estimula la producción de TNF- α en células pre-activadas con LPS. Esto podría entenderse como un efecto pro-inflamatorio por parte de este producto lo que podría conectarse con una elevada respuesta de inflamación que sería beneficiosa en patologías en las que se quiere controlar a agentes infecciosos.

Producción de INF- γ

Observamos en nuestros resultados que en el caso de la adición del extracto de *E. giganteum* a los cultivos celulares e observa que a dosis bajas existe una inhibición en la producción de esta citoquina en las células inducidas con LPS, comparando con las células control que no fueron tratadas. Esto va en línea con los efectos reportados de esta especie como antiinflamatorio, ya que esta citoquina promueve la inmunidad innata.

En el caso de *C. lechlery* se observa también que el extracto inhibe la producción de esta citoquina en células estimuladas con LPS. Dada la múltiple composición del extracto en compuestos de diferente naturaleza química.

En la respuesta del extracto de *E. coca* existe una inhibición leve a 13 μ g/ml en las células inducidas con LPS respecto al control, por lo cual podría decirse que el extracto no tiene actividad en la producción de esta citoquina ni efecto consecuente.

Actividad sobre el Inflamasoma

La principal función de los inflamasomas es iniciar una respuesta inmunitaria y contribuir al mantenimiento de la homeostasis y la reparación de los tejidos, la inflamación impulsada por inflamasomas promueve las defensas inmunitarias e inicia mecanismos de reparación.

Los extractos vegetales mostraron una inducción de la liberación de IL-1 β en neutrófilos y PBMC de manera dependiente de la dosis con un aumento en las células con cebado de LPS. Esto es congruente con lo encontrado en cultivos donde se aprecia el aumento de IL-1 β y de las otras citoquinas pro-inflamatorias como consecuencia de este hecho, ya que IL-1 β estimula la liberación de IL-6 e inhibe la liberación de IL-10.

En las PBMC (acrónimo en inglés) o células mononucleares los extractos vegetales estudiados no mostraron un bloqueo del inflamasoma NLRP3 y AIM2, si bien se observa inhibición de la actividad de Casapasa-1 esto no se expresa como una inhibición completa de la red de inflamasoma. En el caso de los neutrófilos, no se observó ninguna reducción, al contrario, se vio un incremento. Si bien la inhibición de las vías de activación del inflamasoma observadas, aparentemente contradicen lo encontrado en el sobrenadante de los cultivos en los que se detecta niveles elevados de IL-1 β , se puede inferir que el efecto de los extractos estudiados está dado por la activación de la liberación de IL-1 β preformada en las células ya que no existe activación de producción/activación de esta citoquina pro-inflamatoria través de inflamasoma NLRP3 y AIM2.

Con respecto a la relación de la producción de ROS como una vía de estimulación de inflamasoma, las plantas estudiadas mostraron actividad antioxidante permeables a las células, inhibiendo la producción intracelular y extracelular de ROS, esto muestra claramente que no existe estimulación de inflamasoma por parte de los extractos.

10. CONCLUSIONES

El extracto hidroalcoholico de *E. giganteum* no ha mostrado ser tóxico para las células mononucleares y polimorfonucleares en los rangos de 10µg/ml a 100µg/ml ya que permite un alto mantenimiento de la viabilidad celular, además, en estas dosis no se afecta la actividad mitocondrial en las células función importante para el consecuente estallido respiratorio. Además, este extracto no afecta la capacidad de ingerir partículas en células mononucleares y en células polimorfonucleares, más bien estimula a estas células a una mayor capacidad de endocitosis, después de la ingestión el extracto promueve una mayor digestión y muerte de microorganismos. Una función importante sobre las células es que la migración o quimiotaxis no se ve afectada por este extracto a nivel in vitro, lo cual es parte de la inocuidad del producto sobre la inmunidad innata. En cuanto a su actividad sobre citoquinas, se determinó que *E. giganteum* podría ser considerada una planta pro-inflamatoria, actuando mediante la inhibición de las citoquinas antiinflamatorias y la activación de la liberación de citoquinas proinflamatorias, no sobre el inflamasoma.

El extracto hidroalcoholico de *C. lechlery* no se considera toxico para las células mononucleares ni polimorfonucleares en los rangos de 10 a 100ug/ml; se pudo ver el mantenimiento de las características morfológicas y tintoriales de las células en estas concentraciones, además, en este rango no se vio afectada la actividad mitocondrial de las células en su capacidad de donar electrones al reducir la sal de tetrazolio MTT. Asimismo, este extracto no afecta la capacidad fagocitaria en células polimorfonucleares, aunque si se vio un leve descenso de esta actividad en células mononucleares. La capacidad microbicida de las células esta no es afectada por esta especie vegetal observándose más bien un

aumento de esta actividad en células polimorfonucleares en la concentración de 30µg. La capacidad migratoria de células no se vio afectada por el extracto. En su actividad sobre las citoquinas se vio que tiene mayor actividad en la producción de citoquinas proinflamatorias (activa IL-6 sin preestimulación con LPS), las cuales no son por la vía de la activación del inflammasoma, asimismo se observa efectos inhibitorios de IL-10 una citoquina antiinflamatoria.

El extracto hidroalcohólico de *E. coca* no mostro efecto tóxico para las células mononucleares y polimorfonucleares en los rangos de 13 a 1300µg/ml siendo las últimas mayores a las equivalentes de consumo humano indicado por la medicina tradicional, por tanto, se establece un claro margen de seguridad beneficioso al consumo de esta planta. Además, se determinó que favorece la actividad enzimática mitocondrial, hecho que concuerda con los estudios de aumento de la capacidad respiratoria, así mismo, se vio que promueve a un aumento de la capacidad de ingestión de bacterias y la actividad migratoria de polimorfonucleares, aunque no tuvo efecto sobre la actividad microbicida de las células. En lo que respecta a la actividad del extracto sobre la producción de citoquinas se determinó que *E. Coca* tiene un leve efecto en la inhibición de la producción de citoquinas antiinflamatorias(IL-10) sin verse claramente su actividad sobre citoquinas proinflamatorias.

Nuestra hipótesis 1 de trabajo es comprobada en referencia a lo encontrado se confirmó que no existe modificación en la funcionalidad leucocitaria. Así como también la hipótesis 2 se comprueba, por lo encontrado, que hay modificación en los patrones de secreción de citoquinas.

Todo lo anterior permite conocer, por un lado, los límites de seguridad preclínica de estos extractos para efectuar estudios in vitro con concentraciones que muestran inocuidad y, por otro, proyectar estudios in vivo con márgenes de seguridad estimados. Sobre un posible aporte al uso de estas especies vegetales como recursos fitoterapéuticos, lo encontrado permite afirmar que los efectos reportados por la medicina tradicional tienen correlación con su efecto potenciador de la defensa de la inmunidad innata, por tanto, es proclive a tener efectos relacionados con el control de agentes infecciosos.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1 Akira, S. (2000). "The role of IL-18 in innate immunity." Current Opinion in Immunology **12**(1): 59-63.
- 2 Alvarce, R. A. S., L. L. Saldanha, N. L. M. Almeida, V. C. Porto, A. L. Dokkedal and V. S. Lara (2015). "The Beneficial Effect of Equisetum giganteum L. against Candida Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2015**: 9.
- 3 Ali, N. M., S. K. Yeap, H. M. Yusof, B. K. Beh, W. Y. Ho, S. P. Koh, M. P. Abdullah, N. B. Alitheen and K. Long (2016). "Comparison of free amino acids, antioxidants, soluble phenolic acids, cytotoxicity and immunomodulation of fermented mung bean and soybean." Journal of the Science of Food and Agriculture **96**(5): 1648-1658.
- 4 Baggiolini, M., P. Loetscher and B. Moser (1995). "Interleukin-8 and the chemokine family." International Journal of Immunopharmacology **17**(2): 103-108.
- 5 Bernas, T. and J. Dobrucki (2002). "Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes." Cytometry **47**: 236-242.
- 6 Berridge, M. V., P. M. Herst and A. S. Tan (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, Elsevier. **11**: 127-152.
- 7 Biondich, A. S. and J. D. Joslin (2015). "Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas." Wilderness & Environmental Medicine **26**(4): 567-571.
- 8 Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ ." Annual Review of Immunology **15**(1): 749-795.
- 9 Bourdy, G. (2000). "Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group." Journal of Ethnopharmacology **70**: 23.
- 10 Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation Suppl **97**: 77-89.

- 11 BØYum, A., D. LØVhaug, L. Tresland and E. M. Nordlie (1991). "Separation of Leucocytes: Improved Cell Purity by Fine Adjustments of Gradient Medium Density and Osmolality." Scandinavian Journal of Immunology **34**(6): 697-712.
- 12 Brown, G. C., A. Vilalta and M. Fricker (2015). "Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology." Current Molecular Medicine **15**(9): 842-851.
- 13 Cabrera, M. V. and M. Sauvain (1997). "USOS DE LA HOJA DE COCA y SALUD PÚBLICA."
- 14 Casikar, V., E. Mujica, M. Mongelli, J. Aliaga, N. Lopez, C. Smith and F. Bartholomew (2010). "Does Chewing Coca Leaves Influence Physiology at High Altitude?" Indian Journal of Clinical Biochemistry **25**(3): 311-314.
- 15 Cavicchioni, G., A. Fraulini, S. Falzarano and S. Spisani (2006). "Structure–activity relationship of for-I-Met I-Leu-I-Phe-OMe analogues in human neutrophils." Bioorganic Chemistry **34**(5): 298-318.
- 16 Corredor R, C. (1994). "Separación rápida de leucocitos de sangre periférica." Revista de la Facultad de Medicina; Vol. 42, Núm. 1.
- 17 Chen, Z.-P., Y. Cai and J. D. Phillipson (1994). "Studies on the Anti-Tumour, Anti-Bacterial, and Wound-Healing Properties of Dragon's Blood1." Planta Med **60**(06): 541-545.
- 18 Chenoweth, D. E., J. G. Rowe and T. E. Hugli (1979). "A modified method for chemotaxis under agarose." Journal of Immunological Methods **25**(4): 337-353.
- 19 Cherng, J.-M., W. Chiang and L.-C. Chiang (2007). "Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean." Food Chemistry **104**(2): 613-618.
- 20 Churqui, M. P., L. Lind, K. Thörn, A. Svensson, O. Savolainen, K. T. Aranda and K. Eriksson (2018). "Extracts of Equisetum giganteum L and Copaifera reticulate Ducke show strong antiviral activity against the sexually transmitted pathogen herpes simplex virus type 2." Journal of Ethnopharmacology **210**: 192-197.
- 21 Dahlgren, C. (1987). Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine and phorbol myristate acetate: Effects of catalase and superoxide dismutase. *Agents and Actions*, **21**(1), 104-112. doi:10.1007/BF01974930
- 22 Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2007). Measurement of Respiratory Burst Products Generated by Professional Phagocytes. In M. T. Quinn, F. R. DeLeo, & G. M. Bokoch (Eds.), *Neutrophil Methods and Protocols* (pp. 349-363). Totowa, NJ: Humana Press.
- 23 Dahlgren, C., & Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, **232**(1), 3-14. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00146-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00146-5)
- 24 Dahl, M. V. and W. E. Lindroos (1979). "Leukocyte chemotaxis under agarose: Manipulations of serum and plasma before incorporation into agarose can influence cell movement." Journal of Immunological Methods **29**(4): 301-310.
- 25 De Marino, S., F. Gala, F. Zollo, S. Vitalini, G. Fico, F. Visioli and M. Iorizzi (2008). "Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity." Molecules (Basel, Switzerland) **13**(6): 1219-1229.
- 26 de Zoete, M. R., Palm, N. W., Zhu, S., & Flavell, R. A. (2014). Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **6**(12), a016287. doi:10.1101/cshperspect.a016287
- 27 Deguine, J. (2018). "New Flavors in Immunomodulation." Cell **173**(7): 1553-1555.

- 28 Desmarchelier, C., F. W. Schaus, J. Coussio and G. Cicca (1997). "Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals." Journal of Ethnopharmacology **58**(2): 103-108.
- 29 Dinarello, C. A. (1999). "IL-18: A TH1 -inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family." Journal of Allergy and Clinical Immunology **103**(1): 11-24.
- 30 Dolasia, K., M. K. Bisht, G. Pradhan, A. Udgata and S. Mukhopadhyay (2018). "TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity." International Reviews of Immunology **37**(1): 3-19.
- 31 English, D. and B. R. Andersen (1974). "Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque." Journal of Immunological Methods **5**(3): 249-252.
- 32 Farinon, M., P. S. Lora, L. N. Francescato, V. L. Bassani, A. T. Henriques, R. M. Xavier and P. G. de Oliveira (2013). "Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis." The Open Rheumatology Journal **7**: 129-133.
- 33 Faustin B., Lartigue L., Bruey JM, Luciano F., Sergienko E., Bailly-Maitre B., Volkmann N., Hanein D., Rouiller I., Reed JC (2007) El inflammasoma NALP1 reconstituido revela un mecanismo de dos pasos de activación de caspasa-1. *mol. Célula*; 25 :713–724. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.032
- 34 Fischetti, V. A. (1989). "Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior." Clinical Microbiology Reviews **2**(3): 285-314.
- 35 Flannagan, R. S., R. E. Harrison, C. M. Yip, K. Jaqaman and S. Grinstein (2010). "Dynamic macrophage "probing" is required for the efficient capture of phagocytic targets." The Journal of cell biology **191**(6): 1205-1218.
- 36 Flannagan, R. S., V. Jaumouillé and S. Grinstein (2012). "The Cell Biology of Phagocytosis." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **7**(1): 61-98.
- 37 Francescato, L. N., S. L. Debenedetti, T. G. Schwanz, V. L. Bassani and A. T. Henriques (2013). "Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC–ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification." Talanta **105**: 192-203.
- 38 Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea and S. Koyasu (2001). "IFN- γ ; production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends in Immunology **22**(10): 556-560.
- 39 Gajewski, T. F. and F. W. Fitch (1988). "Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones." The Journal of Immunology **140**(12): 4245-4252.
- 40 Galarza, M. P., R; Echalar, L; Aguilar, M (1997). "Efectos del acullicu de coca en el metabolismo de la glucosa."
- 41 Gessani, S. and F. Belardelli (1998). "IFN- γ Expression in Macrophages and Its Possible Biological Significance." Cytokine & Growth Factor Reviews **9**(2): 117-123.
- 42 Gonzales-Carazas, E. F., G. C. Melgarejo-García, L. K. Chávez-Conde, L. J. Arellán-Bravo, E. Carbajal-Lázaro, Y. A. Cabrera-Gómez, G. M. Quiróz-Sáenz, I. N. García-Antúnez, M. Llanto-Aguirre and F. G. Choque-Nolasco (2013). "Efecto terapéutico del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* spp. en anemia ferropénica inducida en ratas Holtzman macho." Anales de la Facultad de Medicina **74**: 7-10.
- 43 Gonzalez-Aparicio, M. and C. Alfaro (2019). "Influence of Interleukin-8 and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation in the Tumor Microenvironment: Is There a Pathogenic Role?" Journal of Immunology Research **2019**: 7.
- 44 Gordon, S. (2016). "Phagocytosis: An Immunobiologic Process." Immunity **44**(3): 463-475.

- 45 Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." The Journal of experimental medicine **184**(1): 19-29.
- 46 Gurung, P., Lukens, J. R., & Kanneganti, T. D. (2015). Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Molecular Medicine*, **21**(3), 193-201. doi:10.1016/j.molmed.2014.11.008
- 47 Hampton, M. B., M. C. M. Vissers and C. C. Winterbourn (1994). "A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils." Journal of Leukocyte Biology **55**(2): 147-152.
- 48 Hanna JM: (1971). "Further studies on the effects of coca chewing on exercise." " Human biology,no. 2, vol. 43: pp. 200-209,.
- 49 Heather A. Parker, N. J. M., Jessie N. Green, Mark B. Hampton, and Christine C. Winterbourn (2014). Neutrophil methods and protocols.
- 50 Hirsch, J. G. (1965). "Phagocytosis." Annual Review of Microbiology **19**(1): 339-350.
- 51 Holbrook, J., S. Lara-Reyna, H. Jarosz-Griffiths and M. McDermott (2019). "Tumour necrosis factor signalling in health and disease [version 1; peer review: 2 approved]." F1000Research **8**(111).
- 52 Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. Zinkernagel and M. Aguet (1993). "Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor." Science **259**(5102): 1742-1745.
- 53 Jabeur, I., N. Martins, L. Barros, R. C. Calhelha, J. Vaz, L. Achour, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira (2017). "Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of Equisetum giganteum L. and Tilia platyphyllos Scop." Food & Function **8**(3): 975-984.
- 54 Jacob John, T. and O. F. Sieber (1976). "Chemotactic migration of neutrophils under agarose." Life Sciences **18**(2): 177-181.
- 55 Jaumouillé, V. and S. Grinstein (2011). "Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis." Current Opinion in Cell Biology **23**(1): 22-29.
- 56 Jones, K. (2003). "Review of Sangre de Drago (Croton lechleri) - A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research." The Journal of Alternative and Complementary Medicine **9**(6): 877-896.
- 57 Kaneko, N., Ito, Y., Iwasaki, T., Takeda, H., Sawasaki, T., Migita, K., . . . Masumoto, J. (2015). Reconstituted AIM2 inflammasome in cell-free system. *Journal of Immunological Methods*, **426**, 76-81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.08.004>
- 58 Kawasaki, T. and T. Kawai (2014). "Toll-like receptor signaling pathways." Frontiers in immunology **5**: 461-461.
- 59 Kress, H., E. H. K. Stelzer, D. Holzer, F. Buss, G. Griffiths and A. Rohrbach (2007). "Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(28): 11633.
- 60 Kubin, M., J. Chow and G. Trinchieri (1994). "Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells." Blood **83**(7): 1847-1855.
- 61 Lage, S. L., Amarante-Mendes, G. P., & Bortoluci, K. R. (2013). Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. *Methods*, **61**(2), 110-116. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.010>

- 62 Lamkanfi, M., & Dixit, Vishva M. (2014). Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
- 63 Leijh, P. C., M. T. van den Barselaar, T. L. van Zwet, I. Dubbeldeman-Rempt and R. van Furth (1979). "Kinetics of phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli by human granulocytes." *Immunology* 37(2): 453-465.
- 64 Leijh, P. C. J., M. T. Van Den Barselaar and R. Van Furth (1981). "Kinetics of Phagocytosis and Intracellular Killing of Staphylococcus aureus and Escherichia coli by Human Monocytes." *Scandinavian Journal of Immunology* 13(2): 159-174.
- 65 Lim, J. J., S. Grinstein and Z. Roth (2017). "Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7: 191-191.
- 66 Liu, Y., D. A. Peterson, H. Kimura and D. Schubert (1997). "Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction." *Journal of Neurochemistry* 69(2): 581-593.
- 67 Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology." *Cell* 104(4): 487-501.
- 68 Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. In *Biological Chemistry* (Vol. 395, pp. 203).
- 69 Ministerio, a. y. m. a. (2016). Plantas de Bolivia con potencial medicinal informacion biologica y bioquimica.
- 70 Mollazadeh, H., A. F. G. Cicero, C. N. Blesso, M. Pirro, M. Majeed and A. Sahebkar (2019). "Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(1): 89-101.
- 71 Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* 65(1): 55-63.
- 72 Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann and M. Modolell (1998). "Murine Macrophages Secrete Interferon γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 187(12): 2103-2108.
- 73 Murakami, M., D. Kamimura and T. Hirano (2019). "Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines." *Immunity* 50(4): 812-831.
- 74 Narazaki, M. and T. Kishimoto (2018). "The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 19(11): 3528.
- 75 Nelson, R. D., P. G. Quie and R. L. Simmons (1975). "Chemotaxis Under Agarose: A New and Simple Method for Measuring Chemotaxis and Spontaneous Migration of Human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes." *The Journal of Immunology* 115(6): 1650.
- 76 Netea, M. G., L. A. B. Joosten, E. Latz, K. H. G. Mills, G. Natoli, H. G. Stunnenberg, L. A. J. O'Neill and R. J. Xavier (2016). "Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease." *Science* 352(6284).
- 77 Ouyang, W., S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez and S. G. Hymowitz (2011). "Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease." *Annual Review of Immunology* 29(1): 71-109.
- 78 Oyola, L. d. B. (1993). "Aspectos Bioquímicos del Uso del Mate de Coca." *Alma Mater* 4: 97-99.
- 79 Panaro, M. A. and V. Mitolo (1999). "Cellular Responses to Fmlp Challenging: A Mini-Review." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21(3): 397-419.

- 80 Petri, B. and M.-J. Sanz (2018). "Neutrophil chemotaxis." Cell and Tissue Research **371**(3): 425-436.
- 81 Pieters, L., T. de Bruyne, M. Claeys, A. Vlietinck, M. Calomme and D. vanden Berghe (1993). "Isolation of a Dihydrobenzofuran Lignan from South American Dragon's Blood (Croton spp.) as an Inhibitor of Cell Proliferation." Journal of Natural Products **56**(6): 899-906.
- 82 Reyes-Díaz, A., A. F. González-Córdova, A. Hernández-Mendoza, R. Reyes-Díaz and B. Vallejo-Cordoba (2017). "Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins." International Journal of Dairy Technology **71**(1): 1-9.
- 83 Ricco, R. A., Agudelo, I., M., G., Evelson, P., Wagner, M. L., & Gurni, A. A. (2011). "polifenoles y actividad antioxidante en Equisetum giganteum L. (Equisetaceae)." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas **10**(4): 325-332.
- 84 Ríos, Y. K., A. C. Otero, D. L. Muñoz, M. Echeverry, S. M. Robledo and M. A. Yepes (2008). "Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla)." Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas **37**(2).
- 85 Risco, E., F. Ghia, R. Vila, J. Iglesias, E. Álvarez and S. Cañigüeral (2003). "Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from Croton lechleri." Planta Med **69**(09): 785-794.
- 86 Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella and L. Minor (2004). Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe et al. Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- 87 Rojas Karla, C. R. (2013). "efecto farmacologico de la hoja de coca Viceministerio de Ciencia y Tecnologia ".
- 88 Rutz, S. and W. Ouyang (2016). Regulation of Interleukin-10 Expression. Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. X. Ma. Dordrecht, Springer Netherlands: 89-116.
- 89 Rutz, S., X. Wang and W. Ouyang (2014). "The IL-20 subfamily of cytokines — from host defence to tissue homeostasis." Nature Reviews Immunology **14**: 783.
- 90 Sharma, M. y de Alba, E. (2021). Estructura, Activación y Regulación de Inflamasomas NLRP3 y AIM2. Revista Internacional de ciencias moleculares , **22** (2), 872. <https://doi.org/10.3390/ijms22020872>
- 91 Schett, G., J.-M. Dayer and B. Manger (2015). "Interleukin-1 function and role in rheumatic disease." Nature Reviews Rheumatology **12**: 14.
- 92 Schiffmann, E., B. A. Corcoran and S. M. Wahl (1975). "N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1059-1062.
- 93 Schindler, H., M. B. Lutz, M. Rölinghoff and C. Bogdan (2001). "The Production of IFN-γ by IL-12/IL-18-Activated Macrophages Requires STAT4 Signaling and Is Inhibited by IL-4." The Journal of Immunology **166**(5): 3075-3082.
- 94 Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. Cell, **140**(6), 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- 95 Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions." Journal of Leukocyte Biology **75**(2): 163-189.
- 96 Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. Cell, **140**(6), 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- 97 Sen, G. C. (2001). "Viruses and Interferons." Annual Review of Microbiology **55**(1): 255-281.

- 98 Showell, H. J., R. J. Freer, S. H. Zigmond, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, B. Corcoran and E. L. Becker (1976). "The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils." J Exp Med **143**(5): 1154-1169.
- 99 Snapper, C. and W. Paul (1987). "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." Science **236**(4804): 944-947.
- 100 Snyderman, R. and E. J. Goetzl (1981). "Molecular and Cellular Mechanisms of Leukocyte Chemotaxis." Science **213**(4510): 830-837.
- 101 Stolberg, V. B. (2011). "The Use of Coca: Prehistory, History, and Ethnography." Journal of Ethnicity in Substance Abuse **10**(2): 126-146.
- 102 Strober, W. (2001). "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." Current Protocols in Immunology **21**(1): A.3B.1-A.3B.2.
- 103 Strober, W. (2015). "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." Current Protocols in Immunology **111**(1): A3.B.1-A3.B.3.
- 104 Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2016). "Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm." Immunotherapy **8**(8): 959-970.
- 105 Tanaka, T., M. Narazaki, K. Masuda and T. Kishimoto (2016). Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. X. Ma. Dordrecht, Springer Netherlands: 79-88.
- 106 Teng, T.-S., A.-L. Ji, X.-Y. Ji and Y.-Z. Li (2017). "Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered." Journal of immunology research **2017**: 9671604-9671604.
- 107 Thomas, M. A., A. B. Kleist and B. F. Volkman (2018). "Decoding the chemotactic signal." Journal of leukocyte biology **104**(2): 359-374.
- 108 Tsitoura, D. C. and Y. Tassios (2006). "Immunomodulation." Annals of the New York Academy of Sciences **1088**(1): 100-115.
- 109 Turvey, S. E. and D. H. Broide (2010). "Innate immunity." The Journal of allergy and clinical immunology **125**(2 Suppl 2): S24-S32.
- 110 Ubillas, R., S. D. Jolad, R. C. Bruening, M. R. Kernan, S. R. King, D. F. Sesin, M. Barrett, C. A. Stoddart, T. Flaster, J. Kuo, F. Ayala, E. Meza, M. Castañel, D. McMeekin, E. Rozhon, M. S. Tempesta, D. Barnard, J. Huffman, D. Smee, R. Sidwell, K. Soike, A. Brazier, S. Safrin, R. Orlando, P. T. M. Kenny, N. Berova and K. Nakanishi (1994). "SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago)." Phytomedicine **1**(2): 77-106.
- 111 Vidya, M. K., V. G. Kumar, V. Sejian, M. Bagath, G. Krishnan and R. Bhatta (2018). "Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals." International Reviews of Immunology **37**(1): 20-36.
- 112 Vistica, D. T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman and M. R. Boyd (1991). "Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production." Cancer Research **51**(10): 2515-2520.
- 113 Werner, G. H., F. Floc'h, D. Migliore-Samour and P. Jollès (1986). "Immunomodulating peptides." Experientia **42**(5): 521-531.
- 114 Williams, J. E. (2001). "Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on *Una de Gato* and *Sangre de Grado*." Altern Med Rev **6**(6): 567-579.
- 115 Winterbourn, C. C. and A. J. Kettle (2012). "Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome." Antioxidants & Redox Signaling **18**(6): 642-660.
- 116 Winterbourn, C. C., A. J. Kettle and M. B. Hampton (2016). "Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function." Annual Review of Biochemistry **85**(1): 765-792.

- 117 Wright, C. I., L. Van-Buren, C. I. Kroner and M. M. G. Koning (2007). "Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence." Journal of Ethnopharmacology **114**(1): 1-31.
- 118 Xiong, Y. and P. A. Iglesias (2010). "Tools for analyzing cell shape changes during chemotaxis." Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro **2**(11-12): 561-567.
- 119 Yoshida, A., Y. Koide, M. Uchijima and T. O. Yoshida (1994). "IFN- γ Induces IL-12 mRNA Expression by a Murine Macrophage Cell Line, J774." Biochemical and Biophysical Research Communications **198**(3): 857-861.

ANEXOS

Anexo 1 identificación del material vegetal por parte del Herbario Nacional de Bolivia



HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA

Casilla 10077 Correo Central, La Paz – Bolivia / Campus Universitario, Calle 27 Cota Cota
Teléfonos (591 -2) 2121751 – 2792582 – 2792416 * Fax (591-2) 2770962
e-mail: direccion.herbariobolivia@gmail.com

PLANTAS COLECTADAS POR: MARIANELA PATZI CH. & CINTHIA CADENA (SELADIS)

Determinado por: Rossy de Michel (LPB)

Fecha : 7 de febrero de 2019

1 Sapindaceae	Sapindus saponaria L.	
2 Rutaceae	Galipea longiflora Krause	
3 Leg. Caesalpinoideae	Copaifera reticulata Ducke	det.A.Fuentes
4 Polypodiaceae	Polypodium decumanum Willd.	
5 Rubiaceae	Uncaria guianensis (Aubl.) J.F.Gmel.	
6 Equisetaceae	Equisetum giganteum L.	
7 Euphorbiaceae	Croton lechleri Muell. Arg.	
8 Leg. papilionoideae	(Esteril)	
9 Araceae	Philodendron undulatum Engl.	
10 Sapotaceae	Chrysophyllum venezuelanense (Pierre) T.D.Penn.	





HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA

Casilla 10077 Correo Central, La Paz – Bolivia / Campus Universitario, Calle 27 Cota Cota
Teléfonos (591 -2) 2121751 – 2792582 – 2792416 * Fax (591-2) 2770962
e-mail: direccion.herbariobolivia@gmail.com

PLANTAS COLECTADAS POR: MARIANELA PATZI & CINTHIA CADENA (SELADIS)

Determinado por: Rossy de Michel (LPB)

Fecha : 16 de agosto de 2019

11 Erythroxylaceae	Erythroxylum coca Lam.	
12 Anacardiaceae	Mangifera indica L.	
13 Leg. Papilionoideae	Tipuana cf. tipu (Benth.) Kuntze	det. F.Zenteno Ruiz



Anexo 2 Manuscritos generados

Departamento de Reumatología e Inflamación - Instituto Sahlgrenska - Universidad de Gotemburgo

Evaluation of the activity of the plant extracts of *Uncaria tomentosa*, *Equisetum giganteum* and *Croton lechleri* to stimulate or block the inflammasome pathway

Elaborated by: Ximena Padilla Lizarazu

Introduction -

Traditional use of plants

In Bolivia there are many ethnic populations that use traditional medicine to prevent or cure diseases, which is why we currently have many studies focused on the study of the different uses of plants in different diseases.

The Tacana dwell in Amazonian Bolivia (Iturrealde Province, La Paz Department) at the base of the last foothills of the eastern Andes. The majority of species used by the Tacanas are cure gastrointestinal disorders such as stomach aches, diarrhea, dysentery, and intestinal cramps. Among the 65 species used to cure these kinds of disorders, 10 were specifically mentioned for use against intestinal worms. Fifty species were designated for relieving skin afflictions (boils, fungal diseases, infected wounds). Twenty-five species were used for gynecological disorders and 10 for uterine hemorrhage during pregnancy or after birth. The Tacana also used 12 species for rheumatic disorders and 10 species to cure leishmaniasis, a protozoan-caused disease with a high incidence rate in the zone (Bourdy, 2000).

Plants

Uncaria tomentosa, so-called "Una de gato", is probably one of South America's most investigated species, and the list of traditional uses is almost endless. Most reported indications are concomitant with inflammatory processes, i.e.: gastritis, dermic and uro-genital inflammations, asthma, rheumatic pains, etc. Among the Tacana, a strongly concentrated bark decoction is administered against rheumatism, irregular menstruation, and in case of digestive, liver and kidney troubles (Bourdy, 1999). Traditionally uña de gato is prepared as a decoction, boiling inner bark or root bark, or is macerated in an alcoholic beverage, using the locally produced sugarcane rum. This extraction method with alcohol results in a higher extraction of alkaloids than when decoctions are prepared with water (Dominguez 1997). The pharmacological actions of uña de gato include antioxidant properties, anti-inflammatory activity, immunomodulation, cytoprotection, antimutagenic properties, and antihypertensive effects (Obregon Vilches, 1996).

Immunomodulating activity includes suppression of NF-kappa B, enhancement of B- and T-lymphocytes, stimulation of phagocytosis, and enhancement of IL-1 and IL-6. In a Peruvian study on rats, the investigators found that phagocytosis was increased when an extract was administered at a dose of 400 mg/kg. In a study by Sandoval et al a water extract showed cat's claw to be, "a remarkably potent inhibitor of TNF- α ". The primary mechanism for cat's claw's anti-inflammatory action appears to be immunomodulation via suppression of TNF- α synthesis (Williams, 2001).

Manuscrito enviado Revista CON-CIENCIA UMSA

La Viabilidad y Funcionalidad de Leucocitos Humanos en presencia de un Extracto Hidro-alcohólico de *E. coca*².

Padilla Ximena, Terrazas Katty, Carvajal Roger.

Unidad de Biomedicina Experimental, Unidad de Virología, Inmunidad e Infección. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS). Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. UMSA, La Paz, Bolivia.

Resumen

Para estudiar el efecto de cualquier producto natural, aunque sea de uso habitual de la medicina tradicional, es necesario establecer previamente los márgenes de seguridad para su utilización en humanos. En el caso de *Erythroxylum coca*, para trazar sus perspectivas de uso como fitofármaco o de producto industrial, es necesario conocer si tiene algún grado de toxicidad o si es completamente inocuo, no obstante, su larga tradición de consumo. En el presente trabajo se exploró el efecto de un extracto hidro-alcohólico de *E. coca* sobre granulocitos y mononucleares de voluntarios donadores humanos, en condiciones de cultivo celular. Se examinó, por un lado, el efecto sobre la viabilidad celular y la actividad del sistema mitocondrial/citoplasmático de óxido-reductasas y, por otra parte, se exploró su efecto sobre la funcionalidad celular a través de la determinación de la capacidad fagocítica, la quimiotaxis, la endocitosis y la actividad microbicida, en el ámbito de la inmunidad innata, y la capacidad de liberación o estimulación de citoquinas en el ámbito de la respuesta inflamatoria. Se encontró que a las dosis equivalentes a la del consumo habitual humano, los leucocitos conservan su viabilidad (0,13µg/ml), la que se mantiene hasta dosis relativamente altas (130µg/ml). En esta franja de seguridad se encontró que *E. coca* no altera la capacidad de las enzimas mitocondriales y citoplasmáticas de óxido-reducción, al contrario, en dosis bajas es capaz de estimular dicha actividad. La actividad quimiotáctica no es afectada por el extracto hidroalcohólico de coca por el contrario a dosis intermedias esta actividad se eleva de manera ostensible. La capacidad endocítica no se ve afectada y por el contrario se pudo observar un estímulo de la misma; en la actividad microbicida no existe cambios significativos. Por tanto, se concluye este producto a las dosis equivalentes a las recomendadas por la medicina tradicional no tiene efectos deletéreos sobre la viabilidad y funcionalidad de los leucocitos humanos. En lo que respecta a la actividad del extracto sobre la producción de citoquinas, se encontró que *E. Coca* tiene efecto de estimulación en la liberación de TNF e inhibición de IL-10 modulando así mayor actividad proinflamatoria.

Palabras Clave: Inmunidad innata, Coca, inflamación, medicina tradicional

² Este estudio se llevó a cabo en el Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, con el financiamiento de los fondos concursables IDH, recursos propios del Instituto SELADIS y el apoyo del Viceministerio de la Coca y Desarrollo Integral, con base en convenio expreso

