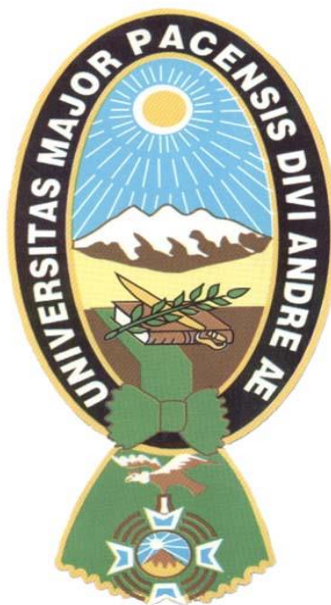


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS Y LABORATORIO EN DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA
INSTITUTO SELADIS



**EVALUACIÓN “*In vitro*” DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANTIOXIDANTE
DE EXTRACTOS DE HOJAS DE *Piper peltatum* (Sipusipu) EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA Y MACROFAGOS RAW-
264.7**

Tesis de Grado para obtener el Título de Especialidad

ELABORADO POR: Lic. ROSALIA LIMACHI VASQUEZ

ASESORA: Dra.: JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS MSc, PhD.

LA PAZ-BOLIVIA

2021

En memoria a mi querida hermana Viviana, por ser mi motivación, eterna compañía, a mis hijos quienes hacen que el sacrificio tengan el mejor significado.

AGRADECIMIENTO

Gracias Señor, porque cada día caminas con nosotros, por tu eterno amor.

A mi amado esposo Pablo, por brindarme su apoyo en todo momento, su comprensión y su admirable amor durante esta etapa de mi vida, por ser mi compañero de vida y llevar de la mano a nuestros preciosos hijos Vivian y Pablito.

A mi querida mamá Martha, por estar siempre a mi lado cuidando de mi a pesar de los años y la distancia, por ser el mejor ejemplo de superación, dedicación y fortaleza. Gracias mama, te amo eternamente.

A mi querido papá Valentin, por ser siempre esa chispa de alegría, por enseñarme a vivir y ser feliz con solo unos minutos.

A mi hermana Marleni, por sus cuidados de siempre, por ser parte de mis experiencias más gratas de mi infancia, gracias por cuidar a tus pequeñas hermanas, por darme los mejores sobrinos, Milan y Luisito.

A mi asesora, Dra. Jacqueline Calla de Magariños, por guiarme y compartir sus conocimientos en el transcurso de mi investigación. Gracias por todos los años de enseñanza, formación y paciencia que me tuvo, porque sus consejos y palabras de aliento en momentos difíciles fueron la base en la conclusión del presente trabajo.

A la Dra, Karina Delgado, gracias por su apoyo y recomendaciones en la conclusión del presente trabajo, por su apoyo y palabras de aliento en momentos difíciles, gracias por su amistad.

A la Dra. Wendy Villarreal, por su gran colaboración en la conclusión de este trabajo. Al Dr. Teddy Quispe, por su valiosa orientaciones y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

Al instituto SELADIS, por ser el principio de una gran historia, con grades formadores profesionales en las diferentes áreas. Al laboratorio de Inmunología, por brindarme la oportunidad de un gran logro, por ser el significado de experiencias llena de gratitud, alegrías y compañerismo, lo mas parecido a un hogar. A mis amigos y compañeros del laboratorio, por su apoyo incondicional y brindarme palabras de aliento y cariño fraternal para continuar, gracias por todo!!!

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MARCO TEORICO	3
2.1	Plantas medicinales	3
2.2	Generalidades de la Familia Piperaceae	4
2.3	Características del género Piper	4
2.4	Distribución geográfica del genero <i>Piper</i>	4
2.5	<i>Piper peltatum</i> (<i>P. peltatum</i>) “Sipusipu”	5
2.5.1	Características Botánicas.....	5
2.5.2	Hábitat	7
2.5.3	Clasificación taxonómica de la especie <i>P. peltatum</i>	7
2.5.4	Usos medicinales	7
2.6	Metabolitos secundarios aislados en el género <i>Piper</i>	8
2.6.1	4-nerolidilcatecol (4-NC).....	8
2.6.2	Compuestos fenólicos	9
2.6.3	Flavonoides.....	10
2.6.4	Fitoesteroles	12
2.7	EL SISTEMA INMUNITARIO	12
2.7.1	La respuesta inmunitaria	13
2.8	LA INFLAMACIÓN	22
2.8.1	Tipos de inflamación	24
2.8.2	Inflamación aguda.....	24
2.8.3	Inflamación crónica	28
2.9	Células y mediadores implicados en el proceso inflamatorio	28
2.9.1	Polimorfonucleares (PMNs)	28
2.9.2	Fagocitos mononucleares	29
2.10	Mediadores químicos de la inflamación	32
2.11	Citoquinas	37
2.12	Actividad antioxidante	39
2.12	Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	40
2.12.2	Daño o estrés oxidativo.....	40
2.12.3	Relación entre el estrés oxidativo y la inflamación.	42
3	ANTECEDENTES	43
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
5	JUSTIFICACIÓN	47
5.1	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	48

6	OBJETIVOS	48
6.1	Objetivo general	48
6.2	Objetivos específicos	48
7	MATERIAL Y MÉTODOS	49
7.1	Diseño de la investigación.....	49
7.1.1	Lugar de estudio	49
7.1.2	Tipo del estudio.....	49
7.1.3	Tamaño de la muestra	49
7.1.4	Comprobación e Identificación taxonómica del material vegetal	49
7.1.5	Reactivo biológico:	49
7.2	Materiales, reactivos y equipos	49
7.2.1	Materiales	49
7.2.2	Reactivos	50
7.2.3	Equipos.....	50
7.1.	PROCEDIMIENTO	51
7.1.1.	Recolección del material vegetal.....	51
7.1.2.	Limpieza y desinfección del material vegetal.....	51
7.2.	Preparación de los extractos	52
7.2.1.	Extracto etanólico de <i>P. peltatum</i> (EEP)	52
7.2.2.	Extracto acuoso de <i>P. peltatum</i> (EAP)	52
7.3.	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC-humana)	54
7.4.	Ajuste de la densidad celular	55
7.5.	Viabilidad celular	56
7.6.	Test de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol MTT 57	
7.7.	Evaluación de citoquinas en sobrenadantes de PBMC-humana	58
7.8.	Determinación de la actividad antioxidante	59
7.9.	Producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7	59
7.10.	Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) 60	
8.	RESULTADOS	63
8.1.	Ensayo de citotoxicidad.....	63
8.2.	Efecto del EEP y EAP sobre la proliferación en PBMC-humana	66
8.3.	Efecto del EEP y EAP en la producción del IFN- γ en PBMC-humana bajo el estímulo de fitohemaglutinina (FHA).....	67
8.4.	Efecto del EEP y EAP en la producción del IFN- γ en PBMC-humana sin estímulo.....	68

8.5. Efecto del EEP y EAP en la producción de la IL-10 en PBMC-humana bajo el estímulo de FHA.	69
8.6. Efecto del EEP y EAP en la producción de la IL-10 en PBMC-humana sin estímulo.....	70
8.7. Efecto de los extractos sobre la producción del óxido nítrico (NO).....	71
8.8. Actividad antioxidante.....	73
9. DISCUSIÓN	79
10. CONCLUSIONES	84
11. BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del género <i>Piper</i>	5
Figura 2. Estructura de <i>Piper peltatum</i>	6
Figura 3. hojas de <i>Piper. peltatum</i>	6
Figura 5. Estructura básica del 4-Nerolidilcatecol	9
Figura 6. Compuesto fenólico	9
Figura 7. Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres	10
Figura8 . Estructura básica de los flavonoides (fenilbenzopirano)	11
Figura 9. Componentes celulares del sistema inmunitario innato y adaptativo	14
Figura 10. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR)	15
Figura 11. Las células T vírgenes pueden sufrir activación y polarización hacia distintas subpoblaciones de células Th.....	19
Figura 12. El proceso inflamatorio	23
Figura 13. Los neutrófilos migran desde los vasos sanguíneos a los sitios de infección	27
Figura 14. Estructura básica de la prostaglandina E2.....	33
Figura 15. Estructura básica del leucotrieno LTB ₄	34
Figura 16: Estructura básica de la lipoxina B4.....	34
Figura 17. Síntesis del óxido nítrico.....	35
Figura 18. Los mecanismos moleculares y celulares de la inmunidad innata y adquirida.....	36
Figura 19. Recolección de las hojas de <i>Piper. peltatum</i>	51
Figura 20. Diagrama de estado del agua	53
Figura 21. Muestra diluida sobre ficoll Hypaque.....	54
Figura 22. Muestra centrifugada con ficoll Hypaque	55
Figura 23. Cámara de neubauer	55
Figura 24. Reacción química de MTT (aguilar 1996)	57
Figura 25. estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	61

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Representación gráfica de la actividad citotóxica del extracto etanólico en PBMC-humana.	64
Gráfica 2. Representación gráfica de la actividad citotóxica del extracto acuoso en PBMC -humana	65
Gráfica 3. Efecto del EAP. y EEP. Sobre la proliferación en PBMC -humana.....	66
Gráfica 4. Producción del IFN- γ en PBMC -humana estimuladas con FHA y tratada con EA y EE de <i>P. peltatum</i>	67
Gráfica 5. La producción de IFN- γ sólo en PBMC -humana y tratadas con EA y EE de <i>P. peltatum</i>	68
Gráfica 6. Producción de la IL-10 en PBMC -humana estimuladas con FHA tratadas con EA y EE de <i>P. peltatum</i>	69
Gráfica 7. Producción de la IL-10 en PBMC -humana sin estímulo y tratadas con EA y EE de <i>P. peltatum</i>	70
Gráfica 8. Efecto de los extractos sobre la producción de nitritos totales por macrófagos murinos raw 264.7	72
Gráfica 9. Curva de la concentración inhibitoria media del ácido ascórbico en la actividad antioxidante.	74
Gráfica 10. Porcentaje de captación de radicales a diferentes concentraciones del EE liofilizado de hojas de <i>P. peltatum</i>	75
Gráfica 11. Curva de la concentración inhibitoria media del EE de hojas de <i>P. peltatum</i> en la actividad antioxidante.....	76
Gráfica 12. Porcentaje de captación de radicales a diferentes concentraciones del EA de hojas de <i>P. peltatum</i>	77
Gráfica 13. Curva de la concentración inhibitoria media del EA de hojas de <i>P. peltatum</i> en la actividad antioxidante.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

EEP	Extracto etanólico de <i>Piper peltatum</i> .
EAP	Extracto acuoso de <i>Piper peltatum</i> .
FHA	Fito hemaglutina
4-NC	4- Nerolidilcatecol
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
NF-kB	Factor Nuclear Kappa
LTB4	Leucotrieno B4
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMPs	Señales endógenas asociadas al daño tisular
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica humana
TLR	Receptores de Tipo Toll
CD	Células dendríticas
APC	Células presentadoras de antígenos
MHC	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
LT	Linfocitos T
LB	Linfocitos B
IL-2	Interleucina 2
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
IFN-γ	Interferón gamma
TGF-β	Factor de necrosis transformador β
LPS	Lipopolisacárido
IgM	Inmunoglobulina M
PMN	Polimorfonucleares
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
OH	Radical oxhidrilo
H₂O₂	peróxido de hidrogeno
FNLp	Formil neoleucil-leucil-fenilalanina
AA	Acido araquidónico
LTA	leucotrieno A
NOS₂	Óxido nítrico sintetasa
nNOS	Óxido nítrico neuronal
eNOS	Óxido nítrico endotelial
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
O⁻²	Radical anión superóxido
O₂	Oxígeno singlete
FLA₂	Fosfolipasa A ₂
COX2	Ciclooxigenasa tipo 2
NK	Células asesinas naturales

TGF-β	Factor β de crecimiento tumoral
TNF-α	Factor α de necrosis tumoral
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappa B
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducida
PG	Prostaglandina
TX	Tromboxano
DL50	Dosis letal 50
DPPH	Radical 1,1-Difenil-2-picril hidrazilo
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
OMS	Organización Mundial de la Salud
IL-13	Interleucinas 13
Ig E	Inmunoglobulina E
FMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FNLP	Formil neoleucil-leucil-fenilalanina
PMN	Polimorfonucleares
ADP	Adenosin difosfato
COX	Ciclooxigenasa
DMSO	Dimetil Sulfoxido
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Solución Amortiguadora de Sales de Fosfato
RAW264.7	Línea celular de Macrófagos Murinos
SFB	Suero Fetal Bovino
Th:	Células T Colaboradoras (del inglés T-Helper).

RESUMEN

La especie de *Piper peltatum* conocido popularmente como “Sipusipu” en el norte del departamento de La Paz-Bolivia, es utilizado de forma empírica para disminuir la inflamación, por lo que es considerada como una fuente potencial de compuestos bioactivos con actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana. El género *Piper* ha sido ampliamente estudiado a nivel mundial y en tanto la medicina tradicional ofrece ciertas ventajas relacionadas con su efectividad, baja toxicidad, costo reducido y sea de fácil accesibilidad es importante profundizar dichos estudios. Es por eso que el objetivo de la presente investigación fue verificar el efecto de los extractos de *Piper peltatum* sobre la producción de IFN- γ e IL-10, citoquinas clave en los procesos inflamatorios, así también se evaluó la actividad antioxidante y la actividad sobre el óxido nítrico (NO) en macrófagos Raw 264.7.

Para esto, se preparó extracto etanólico de *Piper peltatum* (EEP) y extracto acuoso *Piper peltatum* (EAP). Se realizaron pruebas de citotoxicidad, a través del Test de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT). El IFN- γ y la IL-10 se evaluaron en los sobrenadantes del cultivo de células mononucleares por un análisis cuantitativo, Elisa tipo sándwich. El NO fue medido utilizando la reacción de Peter Griess y la actividad antioxidante mediante el ensayo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*), método de captación de radicales libres.

Los resultados mostraron que el EEP y EAP no presentan actividad citotóxica a concentración menor o igual a 10 $\mu\text{g/ml}$, concentración que no afectó la viabilidad celular, pero estimuló significativamente la producción de

IFN- γ con una relación dosis-dependiente de la concentración del extracto, así mismo inhibió la producción de la IL-10 en células previamente estimuladas con fitohemaglutinina (FHA). Los extractos no presentan actividad antioxidante a dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ o menor. Sin embargo, se observó una reducción de la producción de NO.

Los hallazgos sugieren que los metabolitos secundarios presentes en la especie *Piper peltatum* modulan la respuesta inmunitaria innata a través del estímulo de la producción de IFN- γ y la inhibición de la producción de la IL-10. Por tanto, son necesarias futuras investigaciones de cada metabolito presente en la especie *Piper peltatum* y definir sus funciones específicas en la inflamación.

ABSTRACT

The *Piper peltatum* species popularly known as "Sipusipu" in the north of the department of La Paz-Bolivia is used empirically to reduce inflammation, so it is considered a potential source of bioactive compounds with anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial. The *Piper* genus has been widely studied worldwide and while traditional medicine offers certain advantages related to its effectiveness, low toxicity, low cost and easy accessibility, it is important to deepen these studies. That is why the objective of this research was to verify the effect of *Piper peltatum* leaf extracts on the production of IFN- γ and IL-10, key cytokines in inflammatory processes, as well as the antioxidant activity and the activity on nitric oxide (NO) in macrophages Raw 264.7.

For this, ethanolic extract (EEP) and aqueous extract (EAP) were prepared. Cytotoxicity tests were performed, through the reduction of MTT. IFN- γ and IL-10 were evaluated in mononuclear cell culture supernatants by quantitative sandwich ELISA analysis. Nitric oxide (NO) was measured using the Peter Griess reaction and antioxidant activity using the free radical scavenging method (DPPH).

The results showed that EEP and EAP do not present cytotoxic activity at a concentration less than or equal to 10 $\mu\text{g/ml}$, a concentration that did not affect cell viability, but significantly stimulated the production of IFN- γ with a dose-dependent relationship of the concentration of the extract, likewise inhibited the production of IL-10 in cells previously stimulated with FHA. The extracts do not show antioxidant activity at doses of 10 $\mu\text{g/ml}$ or less. However, a reduction in NO production was observed.

The findings suggest that the secondary metabolites present in the *Piper peltatum* species modulate the innate immune response through stimulation of IFN- γ production and inhibition of IL-10 production. Therefore, future investigations of each metabolite present in the *Piper peltatum* species and defining their specific functions in inflammation are necessary.

1 INTRODUCCIÓN

El uso empírico de las plantas medicinales como agente antiinflamatorio, antiviral, antibiótico y antioxidante se ha incrementado en las últimas décadas (WHO, 2004). El interés de utilizar las plantas en la medicina tradicional ha permitido el descubrimiento de tratamientos terapéuticos a partir de compuestos bioactivos que sirven también como precursores sintéticos de medicamentos.

En la actualidad, Bolivia utiliza diferentes plantas medicinales para la atención primaria de salud en comunidades rurales y urbanas, donde los conocimientos tradicionales se han transmitido por generaciones de forma empírica. Bolivia es uno de los 11 países con mayor biodiversidad vegetal, incluye aproximadamente unas 5.000 especies con propiedades medicinales (De Oca, 2005), de las cuales solo un porcentaje reducido cuenta con estudios farmacológicos.

Dentro de esta amplia gama de especies vegetales, existe una gran variedad de plantas pertenecientes a la familia *Piperaceae* tanto en número de especies como en su diversa actividad biológica caracterizada por sus propiedades insecticida, antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria y anticancerígeno (Parmar & Jain, 1997). La especie *Piper peltatum*, conocida popularmente como “Sipusipu” en algunas regiones de la amazonia boliviana, es utilizada como antiinflamatorio, también se le atribuye la actividad diurética, antirreumática, antipirética y como un importante antioxidante por la presencia de alcaloides (Parmar & Jain, 1997)

Diferentes enfermedades, donde la respuesta inmunológica es ineficaz, exagerada o que actúa contra el propio organismo, han dirigido la búsqueda de plantas naturales con actividad inmunomoduladora, que puedan estimular, inhibir o intensificar la participación de factores celulares y humorales en la respuesta inmunitaria.

Se ha reportado que plantas con propiedades antiinflamatoria y citotóxica, con compuestos activos tienen la capacidad de regular la respuesta inmunitaria en ensayos *in vitro* e *in vivo* modulando la actividad de los linfocitos, incrementando o

disminuyendo la liberación de moléculas inflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10) y el interferón gamma (IFN- γ) (Peris & Gómez, 2011).

El estrés oxidativo y los fenómenos inflamatorios se relacionan fisiopatológicamente en varias afecciones, entre las cuales se incluye el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes, así como en condiciones fisiológicas como el envejecimiento, durante el curso del estrés oxidativo se liberan múltiples especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que son importantes en el papel de la patogénesis de las enfermedades inflamatorias (Mahendran & Narmatha, 2013).

El objeto de estudio de la presente investigación es evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* y el efecto antioxidante del extracto acuoso y etanólico de la especie *Piper peltatum*. Los resultados permitirán verificar su potencial medicinal con un soporte científico, con el fin de respaldar el uso tradicional de la planta en nuestro medio y plantearla como una alternativa de tratamiento de fácil accesibilidad.

2 MARCO TEORICO

2.1 Plantas medicinales

El uso de las plantas medicinales es tan viejo como la humanidad, sin embargo, es hacia el año 1865, cuando el doctor Auguste Soins define con el termino fitoterapia la terapia que utiliza las plantas medicinales (Berdonces, 2003). La medicina tradicional fue el único recurso del que disponían los médicos, esto hizo que las primeras culturas en su afán de bienestar y prosperidad empezaran a adquirir conocimientos empíricos sobre la utilización de plantas para curar sus enfermedades (Oliveira, Vásquez, & Bermudez, 2005).

Con el desarrollo de las primeras civilizaciones, el uso de la medicina tradicional empieza a trasmitirse de generación en generación (Oliveira, Vásquez, & Bermudez, 2005). Es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro del Programa de Enfermedades Tropicales ha considerado la investigación de plantas utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades, como esencial y de alta prioridad (Geneva, 2000).

Si bien en la actualidad la medicina moderna está desarrollada en la mayor parte del mundo, las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud principalmente en los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la OMS ha estimado que aproximadamente el 60-80% de la población mundial todavía depende de la medicina tradicional para la atención primaria de la salud (Farnsworth 1985, Akerelo 1993, & WHO 2002).

En Bolivia, la biodiversidad de las plantas está ampliamente distribuida en los bosques amazónicos (Rojas, 2013), enmarca aproximadamente 5.000 especies vegetales propias del país, muchas de ellas han sido aprovechadas y utilizadas tradicionalmente por los pueblos originarios y cumplen una importante función en la salud de los mismos (De Oca, 2005).

2.2 Generalidades de la Familia Piperaceae

El nombre de la familia *Piperaceae* corresponde con el del género *Piper*, descrito por Carolus Linnaeus en 1753. Constituye una de las familias más grandes y antiguas en la historia de la humanidad (Soto, 2015).

La familia *Piperaceae* se caracteriza principalmente por ser arbustos y rara vez como árboles, lianas o epifitos de hojas alternas, enteras, simples a menudo con glándulas de aceites aromáticos, en ocasiones algo carnosas. Presentan flores pequeñas, bisexuales o unisexuales, dispuestas en espádices o espigas opuestas a las hojas, presentan de 1-10 estambres y carecen de pétalos, con fruto en baya carnosa con una sola semilla (Soto, 2015).

2.3 Características del género Piper

La familia *Piperaceae* comprende 14 géneros y aproximadamente entre 1950 a 2000 especies, los especímenes de *Piper* son esporádicos en su ambiente natural, numerosas especies son arbustos, hierbas o bejucos, a veces epifitas, las partes vegetativas a menudo presentan aroma cuando son estrujadas (Quijano, Callejas, & Miranda, 2006).

La escasa generación natural y la pérdida rápida de la viabilidad de las semillas de *Piper* la hacen una especie de flora muy particular, de importancia creciente por sus propiedades biológicas para realizar estudios de investigación aplicada (Delgado, García, Ybarra, Luna, & Martínez, 2012).

2.4 Distribución geográfica del género Piper

Los patrones de distribución de las especies de *Piper* varían desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica (Jaramillo, 2006). El género *Piper* se encuentra en regiones tropicales y subtropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 300 especies).

Entre las especies correspondiente a la familia *Piperaceae*: *Piper* y *Peromia* son los géneros más abundantes con 700 y 600 especies, respectivamente (Danelutte A. , Lago, Young, & Katto, 2003).



Figura 1. Distribución geográfica del género *Piper*.

http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/piperaceae.

2.5 *Piper peltatum* (*P. peltatum*) “Sipusipu”

2.5.1 Características Botánicas

La especie de *P. peltatum* conocida popularmente con el nombre de “Sipusipu” en el norte de La Paz- Bolivia, habita principalmente en bosques de tierras bajas o matorrales húmedos y tropicales (De la Torre, Navarrete, Muriel, & Marcia, 2008).

P. peltatum se caracteriza por ser erecta y rígida, de 0.5 m. a 2 m. de altura, escasamente ramificadas, los tallos diminutamente puberulentos y sus hojas son enteras, suborbiculares, flácidas de 16 a 35 cm. de largo y de 14 a 34 cm. de ancho a menudo peltadas, acorazonadas en la base con nervios en ambas caras, exhibe finos puntos traslucidos con la venas palmeadas y el nervio central con uno o dos nervios pennados a cada lado como se observa en la figura 2 (Mejia & Renfijo, 2000).

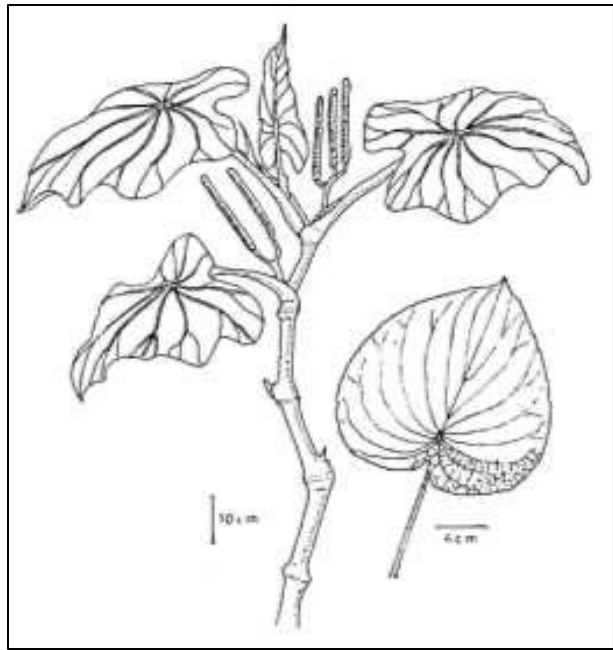


Figura 2. Estructura de *Piper. peltatum*

Fuente: (Mejia & Renfijo, 2000)

Las flores de *P. peltatum* presentan la característica de encontrarse en espigas de color blanco umbeladas sobre pedúnculos axilares, el pedúnculo más corto que el pecíolo, de 1 a 7 cm. de largo y 4 mm de grosor, y el fruto es sub-globuloso en un tamaño aproximado de 0.5 a 0.8 mm. (Mejia & Renfijo, 2000).



Figura 3: Hojas de *Piper peltatum*

Fuente: Recolección propia.



Figura 4: Flores de *Piper peltatum*

Fuente: Recolección propia.

2.5.2 Hábitat

En Bolivia se encuentran alrededor de 35 especies del género *Piper*. *P. peltatum* es una de las especies más común en los bosques húmedos y en matorrales de tierras bajas, especialmente en regiones tropicales desde 600 hasta los 1600 metros de altitud (Tebbs, 1993). Es nativa de México, Centro América, las Antillas y Sudamérica (Pinto, 2006).

2.5.3 Clasificación taxonómica de la especie *P. peltatum*

Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta (Angiospermas)
Clase:	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>

Fuente: (Heywood, 1978).

2.5.4 Usos medicinales

La especie de *P. peltatum* tiene diferentes aplicaciones terapéuticas, es requerida por su actividad antiinflamatoria, diurética y antipirética (Soto, 2015), analgésica y antioxidante (Perazzo, y otros, 2005).

La parte más utilizada son las hojas y en ocasiones toda la planta. La planta actúa como tónico estomacal, como remedio para edemas y escorbuto. Las hojas son utilizadas para tratar enfermedades de la piel, para aliviar el dolor de cabeza, fiebre y contusiones. Cuando es aplicada en forma de cataplasmas es utilizada como emoliente madurativa del puchichi (Gupta, Santana, & Alex, 2000). El cocimiento de

las hojas alivia la inflamación de los testículos y otras inflamaciones como hinchazones o forúnculos de la piel (Rivera, 2008).

Las hojas frescas de *P. peltatum* son aplicadas como emolientes para tratar enfermedades del hígado, se dice que disuelve cálculos renales. Las hojas estrujadas calentadas son aplicadas en tumores y úlceras, cura espasmos musculares, dolor de estómago y baños de té de las hojas se usan como galactagogos (Cleaves, 2002).

En la medicina tradicional boliviana, peruana y brasileña las hojas de *P. peltatum* son maceradas en agua y aplicadas en la zona inflamada o también en casos de cefalea y fiebre. La cocción de la raíz es muy estimada como diurético, estimulante del sistema linfático, tratamiento de úlceras y quemaduras de la piel (Breitbach, 2013).

2.6 Metabolitos secundarios aislados en el género *Piper*

Los estudios fitoquímicos de las especies del género *Piper* han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, entre las que destacan: los flavonoides, kavapirona, lignanos, neolignanos, piperolidos, propenilfenoles, terpenos, fitoesteroles, amidas y el 4-nerolidilcatecol ubicados parcialmente en semillas, hojas, corteza del tallos y raíz (Soto, 2015).

2.6.1 4-nerolidilcatecol (4-NC)

4-NC es un valioso producto natural que tiene importantes propiedades antiinflamatoria, antipalúdica y antioxidante. 4-NC es el principal metabolito secundario de los extractos de *P. peltatum* y *P. umbellatum* (Silva & Oliveira, 2013) .

La estructura química del 4-NC se describió por primera vez en un extracto de hexano (Kijoa y col.1980), se encuentra en las raíces, hojas e inflorescencia, tiene importante actividad antioxidante y antiparasitaria *in vitro* e *in vivo* (Silva & Oliveira, 2013). 4-NC contiene derivados de catecol con propiedades antivirales denominados peltatol A, B y C (Gustafson K. , 1992).

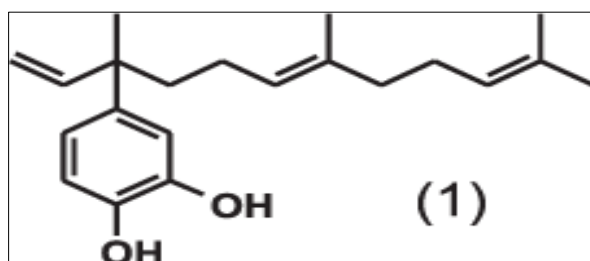


Figura 5. Estructura básica del 4-nerolidilcatecol

Fuente: (Silva & Oliveira, 2013)

2.6.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan un anillo aromático, unido por lo menos a un grupo oxhidrilo, relativamente polares, varían ampliamente en su estructura, se encuentran en las plantas y se clasifican en diferentes tipos de grupos funcionales, tales como: fenoles simples, fenoles ácidos, ácidos hidroxibenzoicos, cumarinas, quinonas, lignanos y ligninas (Peñarrieta & Tejada, 2014).

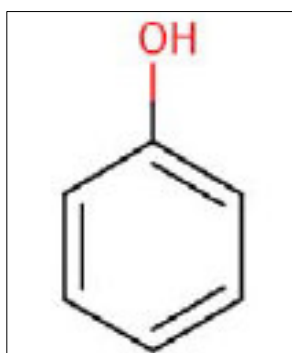


Figura 6. Compuesto fenólico

Fuente: (Peñarrieta & Tejada, 2014)

Se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos, los cuales se han dividido en dos grandes grupos los flavonoides y los no flavonoides, estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas como los ácidos fenólicos con esqueletos químicos de seis carbonos. Los ácidos fenólicos presentan numerosas propiedades farmacológicas como bactericidas, fungicidas, antivirales, protectores cardiovasculares, antioxidantes,

antiestrogénicos, antiinflamatorios, anticarcinógenos y antimutagénicos *in vitro* como *in vivo* (Peñarrieta & Tejada, 2014).

Los polifenoles ejercen acciones de carácter antiinflamatorio sobre varios tipos celulares, poseen un efecto modulador sobre la proliferación de linfocitos T y B activadas, y normalmente este efecto es de tipo inhibitorio (Peñarrieta & Tejada, 2014). También afectan a otras células de la inflamación, como los macrófagos y neutrófilos (Kim, 2004).

Una de las principales funciones de estos compuestos fenólicos es secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical (Figura 7).

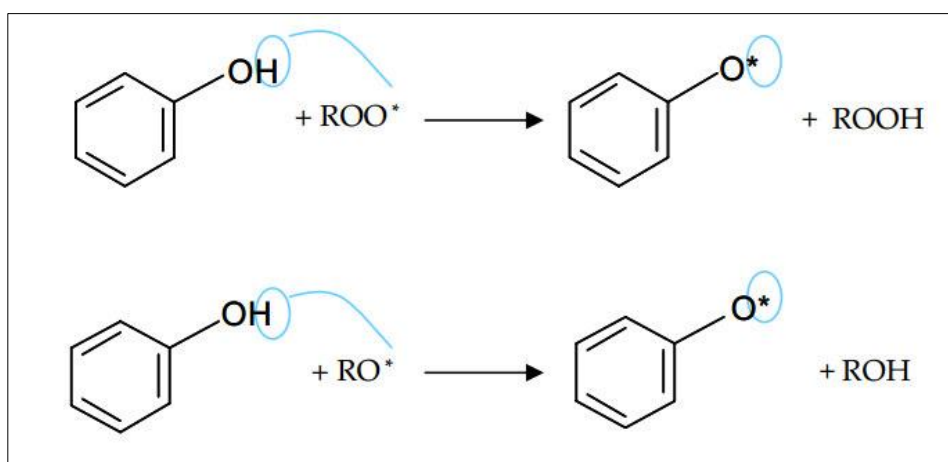


Figura 7. Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres

Fuente: (Kim, 2004).

2.6.3 Flavonoides

Los flavonoides tienen un esqueleto químico que consta de tres porciones, dos anillos aromáticos (A y B) ligado a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) oxigenado, comparten un esqueleto común de difenil pirano (C6-C3-C6) los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'.

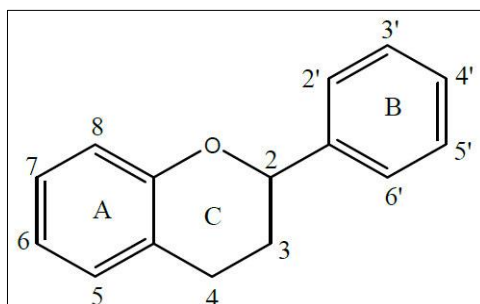


Figura 8. Estructura básica de los flavonoides (fenilbenzopirano)

Fuente: (Peñarrieta & Tejada, 2014)

Los flavonoides conforman el grupo más variado estructuralmente y están ampliamente distribuidos en el género *Piper*. Dentro los principales tipos de los flavonoides se aislaron las flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas. Las diferentes clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y la sustitución de grupos en el anillo C, mientras los componentes individuales dentro de una clase difieren en la sustitución en los anillos A y B (Moreira & Spitzer, 2000).

Entre los mecanismos propuestos para explicar los beneficios de los flavonoides para la salud se encuentra la actividad antioxidante y el efecto antiinflamatorio (Moreira & Spitzer, 2000). También, se determinaron otras aplicaciones farmacológicas como actividad hepatoprotectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana y antifúngica (Benavente & Castillo, 2008).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres por su bajo potencial redox, son capaces de reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell, Rafter, & Jenner., 2005).

Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante “*in vitro*”, son capaces de barrer un amplio rango de ROS, nitrógeno, y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores (Moreira & Spitzer, 2000).

Los flavonoides en la inflamación: Regulan la actividad de enzimas inflamatorias e inhibe la producción de oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Reduce los niveles de producción y expresión de citoquinas y modula a los factores de transcripción, tales como el factor nuclear kappa (NF-kB) y activación de las proteínas. También Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico por tanto, evita el incremento de la prostaglandina E2 (PGE2) y en menor medida el del leucotrieno B4 (LTB4) (Fernandez, Saenz, & Garcia, 1998).

2.6.4 Fitoesteroles

A los fitoesteroles se les atribuye funciones como antiinflamatorio aunque limitada, poseen propiedades antioxidantes, incrementan la producción de córticoesteroides y retardan su degradación (Rios Cañavate, 1994-1995). También juegan papeles importantes en enfermedades cardiovasculares gracias a su influencia en el nivel de colesterol en la sangre, ayudan a prevenir aterosclerosis y enfermedades coronarias (Moreno, 2003).

Se ha demostrado que el β sitosterol reduce la producción de anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico (NO), PGE2 y LTB4 inducidos con ésteres del forbol en macrófagos y se plantea que estos efectos pudieran estar relacionados con la modulación de NF-kB. Los fitoesteroles también pueden estar relacionados con el crecimiento y proliferación de las células, aunque se desconoce la forma en que se lleve a cabo (Moreno, 2003).

2.7 EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario de los vertebrados está compuesto de células y moléculas con funciones especializadas cuyo propósito final es el de preservar y proteger al organismo, y también proporciona un sistema de vigilancia para monitorizar la integridad de los tejidos del huésped.

2.7.1 La respuesta inmunitaria

Entre las funciones básicas de la respuesta inmunitaria se encuentra el reconocimiento de sustancias y organismos extraños que han ingresado en el cuerpo y la eliminación de estos agentes por células y moléculas que actúan manteniendo la tolerancia a antígenos propios y extraños que no tienen potencial patogénico (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Se sabe cada vez mejor que además de las infecciones, los daños en los tejidos por traumatismo, quemaduras y ciertas toxinas, conducen a la muerte celular no fisiológica que puede provocar la activación del sistema inmunitario. En esta situación las moléculas que activan el sistema inmunitario derivan de lo propio, moléculas que no se encuentran normalmente en el espacio extracelular. Polly Matzinger llamo a estas moléculas “señales de peligro”, escapan cuando una célula muere a través de un modo no controlado de muerte celular llamado necrosis (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

El sistema inmunitario en los vertebrados está constituido por diferentes niveles de defensa, en primer lugar hay una barrera física contra las infecciones que es proporcionada por la piel, superficie externa del cuerpo. El segundo nivel de defensa es proporcionado por el sistema inmunitario innato de acción relativamente amplia muy eficaz y poco específica, las células que participan son las NK (*natural killer*), fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos, células dendríticas), y fagocitos polimorfonucleares (mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos), los cuales liberan factores humorales, interferones, citoquinas y sistema del complemento (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

El sistema inmunitario adaptativo lanza un ataque específicamente adaptado cuando la respuesta inmunitaria innata es superada ante la infección de determinados patógenos. Por lo cual, la respuesta inmunitaria adaptativa es un mecanismo mucho más evolucionado, presenta alta especificidad a distintos tipos de agentes infecciosos y con capacidad de responder con más intensidad a exposiciones repetidas.

Los componentes son linfocitos B, T y sus productos de secreción (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

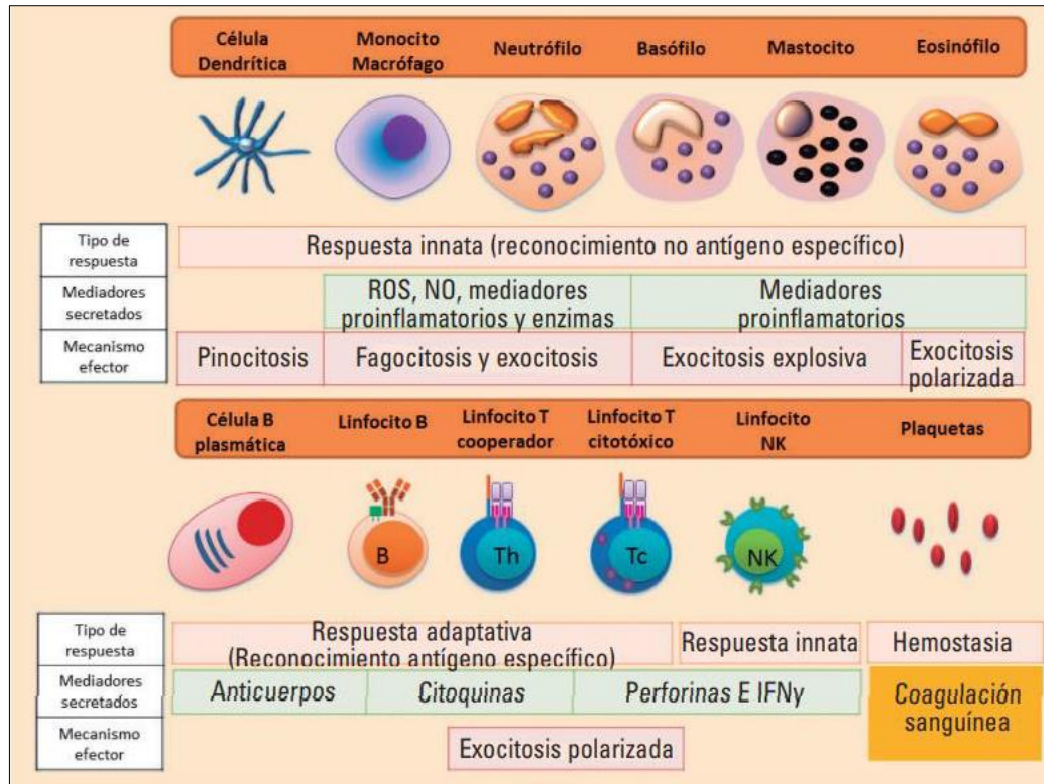


Figura 9. Componentes celulares del sistema inmunitario innato y adaptativo. Principales características en función del tipo de respuesta realizada, su mecanismo efector y los mediadores secretados. IFN: interferón; NK: natural killer; NO: óxido nítrico; ROS: especies reactivas de oxígeno (Montserrat Sanz, 2017).

2.7.1.1 La respuesta inmunitaria innata

Ante la entrada de un agente extraño en el cuerpo, la respuesta inmunitaria innata es la primera barrera de defensa basada en mecanismos inespecíficos y de acción inmediata, carente de memoria, no requiere sensibilización previa ya que existe en el individuo desde el nacimiento y no mejora con el encuentro frecuente con el mismo agente infeccioso.

El sistema inmunitario innato reconoce componentes ampliamente conservados de agentes infecciosos, como los patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns PAMPs*) y señales endógenas asociadas al daño tisular (*Damage associated molecular patterns DAMPs*) mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Al detectar un PAMP, el sistema inmunitario innato monta un ataque inmediato sobre cualquier elemento que muestre estas moléculas (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

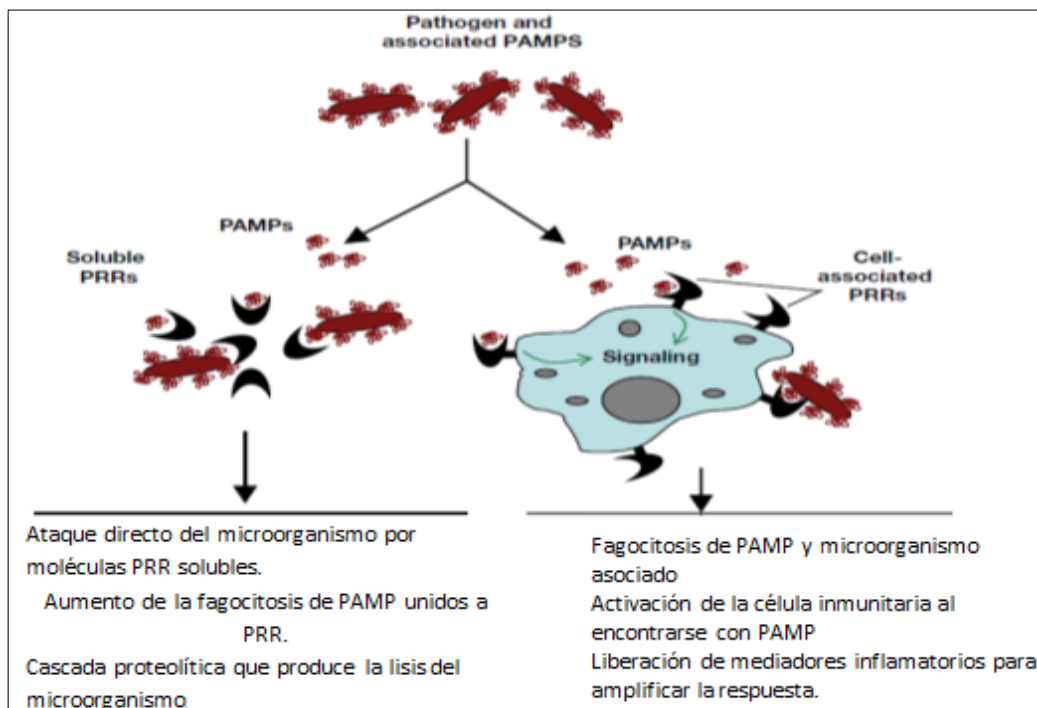


Figura 10. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) detectan patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) e inician la respuesta inmunitaria (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Las principales células encargadas de la primera línea de defensa son las células epiteliales, los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas (CD) y una población linfocitaria con actividad lítica pero que carece de receptores específicos, además, presenta una gran variedad de proteínas solubles bactericidas (destructora de bacterias) como componentes del sistema del complemento y lisozimas (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Las células presentadoras de antígenos (APC), en especial las células dendríticas y los macrófagos juegan un papel fundamental en la conexión entre la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presente en su superficie celulares (Medzhitov, 2007).

2.7.1.2 La respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta inmunitaria adaptativa tarda más en alcanzar una importancia funcional, en general 4 a 5 días después de la respuesta inmunitaria innata, pero están específicamente adaptadas a la naturaleza del antígeno y mejora en cada encuentro con un agente infeccioso determinado, debido a una característica denominada memoria inmunitaria.

La respuesta inmunitaria específica esta mediada por los linfocitos T y linfocitos B que muestran receptores específicos en sus membranas citoplasmáticas capaces de reconocer una gama casi ilimitada de estructuras antigénicas, el reconocimiento del antígeno por un linfocito induce la proliferación y la diferenciación de estas células. Esto engrosa rápidamente las filas de los linfocitos capaces de enfrentar al agente infeccioso que posee el antígeno específico y produce una respuesta de memoria si se encuentra con el mismo antígeno (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Linfocitos T (LT)

Los LT se caracterizan por poseer receptores específicos para los antígenos, denominados receptores de células T o TCR (con cadenas $\alpha\beta$), los cuales reconocen péptidos antigénicos unidos a proteínas codificadas por los genes del MHC (Medzhitov, 2007).

Los LT se originan en la medula ósea y llegan al timo como células inmaduras incapaces de realizar su función inmunológica; son doble negativas, es decir, carecen de los marcadores CD4 y CD8. Estas células T inmaduras luego se diferencian a

linfocitos T doble positivos, para finalmente madurar a linfocitos T simples con un solo marcador. Los LT CD3 se dividen en: células T cooperadoras (Th, de T *helper*), las cuales además del CD3, expresan CD4; y las células T citotóxicas (Tc, de T *cytotoxic*), que expresan CD3 y CD8 (Salinas M. , 2011).

Las subpoblaciones de linfocitos Th CD3/CD4, se caracterizan por su capacidad de participar en el desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida, las moléculas CD4 actúan como correceptores para las moléculas de clase II del MHC, se subdividen en linfocitos Th1, Th2, T reguladoras (Treg) y Th17, de acuerdo con el patrón de citoquinas que secretan y sus funciones efectoras.

Los linfocitos Th1 producen interleucina 2, interleucina 12 (IL-2, IL-12) e interferón gamma (IFN- γ). Los Th2 promueven la respuesta inmunitaria humoral, que se caracteriza principalmente por la presencia de la interleucina 4 e interleucina 5 (IL-4, IL-5), que inducen la activación y diferenciación de células B. Por otro lado, las células T reguladoras secretan factor de necrosis transformador beta (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10), los cuales modulan o inhiben la respuesta inmune celular o humoral. Mientras tanto las células Th17, caracterizadas por la secreción de la IL-17 (Salinas M. , 2011).

Actividades biológicas de los Linfocitos T CD3/CD4

Las células Th1 secretan perfiles de citoquinas orientadas a coordinar respuesta contra infecciones bacterianas y virales intracelulares a través de la activación de macrófagos y LT citotóxicos productoras de IFN- γ (figura.11). La presentación de un antígeno específico mediante las moléculas de clase II del CMH en el macrófago conduce a la secreción de IFN- γ por las células Th1. Sin embargo, los macrófagos no son muy sensibles al IFN- γ por lo cual las células Th1 estimulan funciones efectoras y la activación de los macrófagos mediante el receptor CD40 que aumenta su sensibilidad al IFN- γ . Los macrófagos estimulados también producen IL-12, que conducen al refuerzo del fenotipo Th1.

Las células Th1 también secretan concentraciones de IL-2 que sostienen la expansión de las células T citotóxicas, la generación de la interleucina IL-3 (IL-3) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) tienen efectos más distantes sobre los precursores de la médula ósea e inducen la producción de neutrófilos y macrófagos durante una infección (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

La subpoblación Th2 producen las interleucinas 4, 5, 6 (IL-4, IL-5, IL-6) e interleucinas 13 (IL-13) las cuales activan y ayudan a la proliferación de las células B para transformarlas en células de memoria y células plasmáticas. Los linfocitos Th2 son muy buenos colaboradores de las células B y parece que están adaptados para la defensa contra parásitos y otros patógenos extracelulares que son vulnerables a la inmunoglobulina E (IgE) activada por la IL-4, a la eosinofilia inducida por la IL-5 y a la proliferación de las células cebadas estimuladas por la IL-3 e IL-4.

Las células Th17 se caracterizan por la secreción de la interleucina 17 (IL-17), la cual juega un papel importante en la inflamación crónica característica de enfermedades autoinmune o alérgicas. Las células Th17 producen IL-17A y también secretan IL-17F, IL-21 e IL-22. Estas células parecen estar especializadas en montar respuestas inflamatorias masivas contra infecciones bacterianas extracelulares bacterianas y micóticas, sobre todo en la interface de las mucosas (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Las células T también se diferencian en células que ejercen una función supresora o reguladora en la respuesta inmunitaria. Estas células se denominan, células T reguladoras o Treg, de las que hay dos categorías de células reguladores; *naturales* e *inducible*. Estas células suprimen la respuesta contra antígeno propio, así como la respuesta inapropiada contra antígenos no propios.

Las células T reguladores derivadas del timo o naturales expresan CD4, CD25+FOXP3+ que pueden suprimir respuestas inmunitarias de células T autorreactivas que se desarrollan en el timo y se liberan como células funcionalmente maduras. Las células T reguladores inducibles se generan a partir de las células T vírgenes en la periferia después del contacto con el antígeno, presentado por las células dendríticas. Las células Th3 representa una población, encontradas en las

mucosas que secretan IL-4, IL-10 y TGF- β , importantes para la tolerancia hacia microorganismos comensales que habitan el tracto intestinal (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

La producción de citoquinas inmunosupresoras como la IL-10, TGF- β o la IL-35 ejerce sus funciones por varios mecanismos. La IL-10 suprime la respuesta de células T al inhibir la producción de la IL-2, IL-5, inhibe la sobreexpresión de moléculas de clase I del MHC y ligando B7 coestimuladores de las células dendríticas y macrófagos. El TGF- β bloquea la producción de citoquinas por las células T, así como la citotoxicidad y la proliferación (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

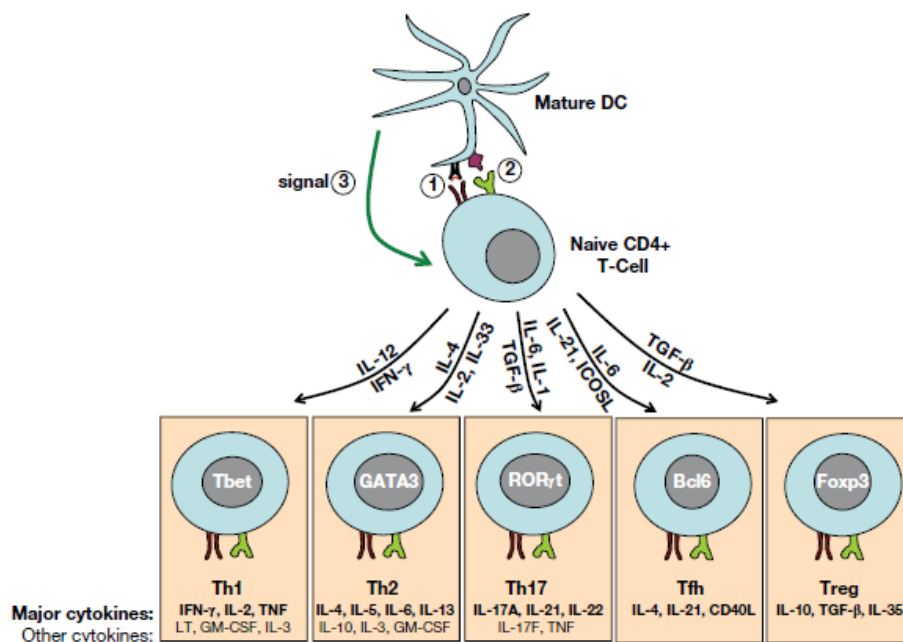


Figura 11. Las células T vírgenes pueden sufrir activación y polarización hacia distintas subpoblaciones de células Th, las citoquinas producidas por las células dendríticas u otras células de la inmunidad innata (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Los linfocitos T CD3/CD8, están restringidos al reconocimiento de péptidos en el contexto de MHC-I, una vez activados, los LT pueden convertirse en células efectoras citotóxicas o células de memoria. Las células CD8 citotóxicas tienen actividad lítica, poseen un papel crítico en el reconocimiento y eliminación de células propias alteradas (células infectadas por virus o bacterias intracelulares y células tumorales).

Las moléculas de clase I del MHC se expresa en todas las células nucleadas, por lo tanto, los linfocitos T CD8 pueden reconocer y eliminar cualquier célula que presente el antígeno a través de la clase I del MHC. Los linfocitos T CD8 activados eliminan a sus células diana a través de dos mecanismos. El primero consiste en la liberación de granzimas y perforinas relacionados con la lisis celular, secretan citoquinas como factor de necrosis tumoral- β (TNF- β) e IFN- γ y activan macrófagos. El segundo consiste en el contacto directo vía ligando Fas. Dicho ligando causa la muerte celular por apoptosis (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Linfocitos B (LB)

Normalmente, los LB requieren de los LT para generar anticuerpos de alta afinidad y sufrir un cambio de clase. Sin embargo, ciertos tipos de antígenos (llamados antígenos timoindpendiente) pueden promover la activación de células B sin la colaboración de las células T, los anticuerpos así formados suelen ser de baja afinidad, pero proporcionan protección rápida frente a ciertos microorganismos mientras se forme la respuesta de las células B que dependen de las células T (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Antígenos timoindpendiente de tipo 1: ciertos antígenos como el lipopolisacarido (LPS) de bacterias, en una concentración elevada, activan en forma policlonal una proporción importante de la dotación de células B, esto se produce mediante la unión a moléculas de superficie como los receptores de tipo toll (TLR).

Antígenos timoindpendiente de tipo 2: algunos antígenos lineales que tienen una determinante muy repetida por ejemplo, polisacáridos de *Pneumococo*, polímeros de D-aminoácidos y polivinilpirrolidona con dificultad en su degradación en el organismo, también son timoindpendiente en su capacidad para estimular las células B por las inmunoglobulinas de membrana inmunoglobulina M (IgM) e induce la generación de células plasmáticas responsables de la síntesis de anticuerpos (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Muchos antígenos son timodependientes, estos antígenos no pueden satisfacer los requerimientos moleculares para la estimulación directa, las células B se comporta como una célula presentadora de antígeno. A través de la IgM, las células B reconocen los antígenos para después endocitarlos, procesarlos y presentarlos en el contexto clase II del MHC a las células T CD4. La interacción entre ambos linfocitos es estabilizada por moléculas accesorias. El linfocito Th libera citoquinas que inducen la proliferación y diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos o de células B de memoria (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Células *natural killer* (NK)

Las células *natural killer* son una población de leucocitos que, como los LT y LB, emplean receptores que pueden provocar su activación capaces de secretar citoquinas, notablemente el IFN- γ . Los macrófagos responden al IFN- γ con el incremento de sus actividades microbicidas y el aumento de citoquinas como la IL-12 que tienen efectos sobre las células del sistema inmunitario adaptativo. Otro efecto del IFN- γ es mejorar la presentación de antígeno en las células dendríticas, importantes para la activación del sistema inmunitario adaptativo (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

Las células *NK* expresan ciertos cúmulos de diferenciación encontrados en los LT, pero expresan además CD16 y CD56. Participan en la respuesta inmunitaria innata contra virus y células tumorales mediante mecanismos de lisis celular similares a los mecanismos efectuados por los LT citotóxicos. Los gránulos contienen perforinas, que inducen la muerte celular por lisis osmótica, y granzimas, que inducen señales intracelulares para promover la muerte celular programada (apoptosis).

También las *NK* pueden llevar efectores citotóxicos mediante la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, debido a que estas células cuentan con receptores para la región Fc, el mecanismo ocurre cuando el anticuerpo se encuentra unido a la superficie de una célula blanco infectada por el patógeno, esto es reconocido por la célula *NK* a través de los receptores liberándose citoquinas y los gránulos citotóxicos que contiene perforinas y granzimas (Salinas M. , 2011).

2.8 LA INFLAMACIÓN

La inflamación es considerado un proceso biológico que se presenta solamente en los tejidos vascularizados, es un mecanismo de defensa donde involucra una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares en respuesta a una agresión física (calor, radiación, traumatismo), químicos (corrosivos), biológica (microorganismos) e inmunológicos (enfermedades autoinmunes y reacciones de hipersensibilidad), es necesaria para la supervivencia, pero está involucrada en el daño y es responsable de molestias generales o locales (Salinas M. , 2011).

Factores de la inflamación

El daño producido en los tejidos mediado por estímulos endógenos y/o exógenos son inductores que inicia el proceso inflamatorio y activa la respuesta inflamatoria, se activa la producción de mediadores, esto a su vez altera los estados funcionales, sensoriales de las células del sistema inmunitario innato y adaptativo, tejidos y órganos, que son los efectores de la inflamación.

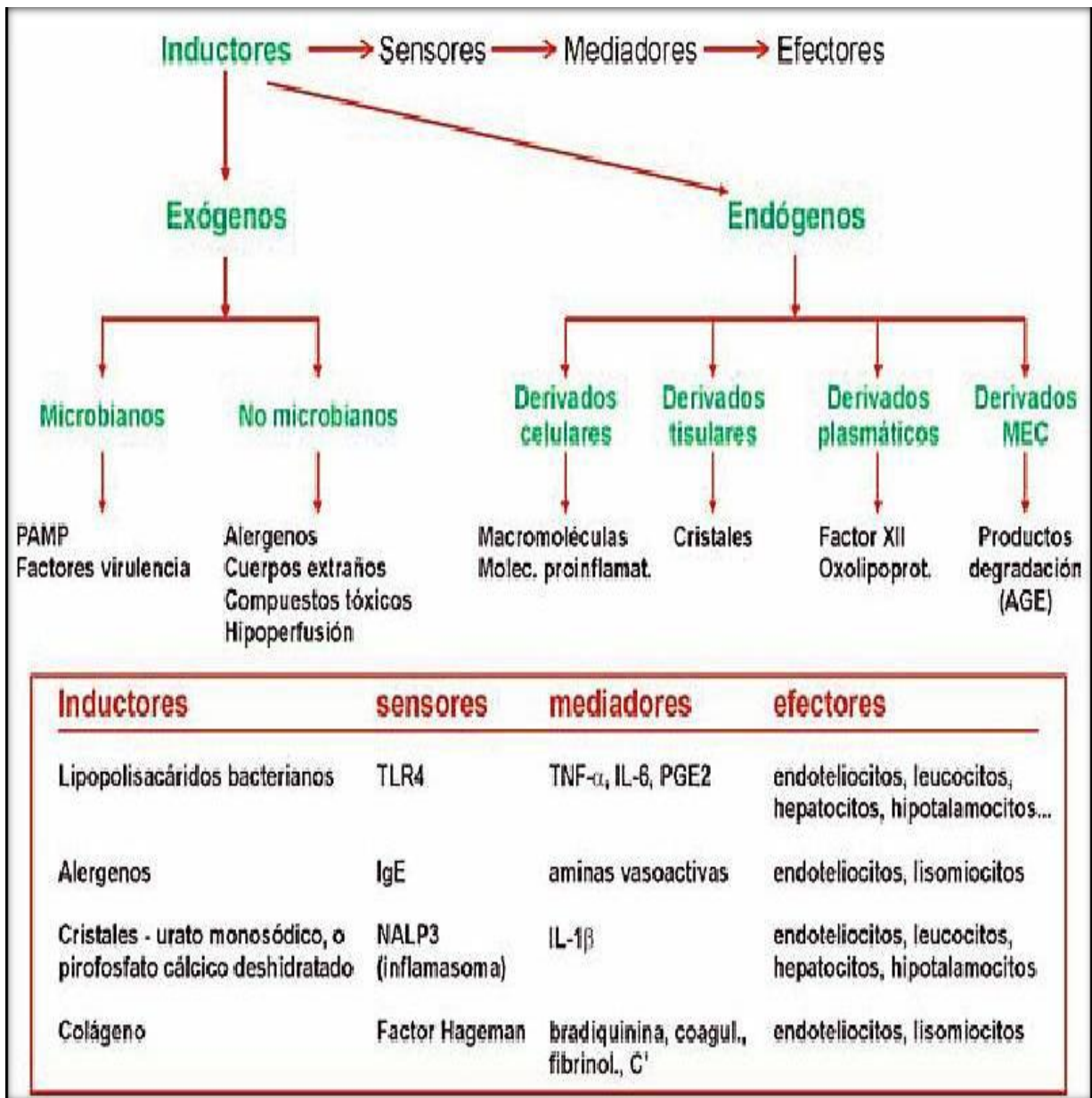


Figura 12. El proceso inflamatorio incluye: inductores, sensores, mediadores y efectores. Los inductores se clasifican en exógenos y endógenos, y ellos a su vez, en otras clases. Los diferentes inductores operan a través de distintas vías. AGE: *Productos finales de glicación avanzada*, NALP: Miembro de la familia NLR (García, 2008).

2.8.1 Tipos de inflamación

La inflamación también puede ser clasificada como aguda y crónica, según el tiempo de duración y las células que predominan en el tejido inflamado:

2.8.2 Inflamación aguda

Se considera aguda cuando el tiempo transcurrido entre la aparición de las manifestaciones anatómica, sistémicas o celulares dura desde horas hasta algunos días y predominan los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el tejido afectado, se caracteriza por presentar vasodilatación local transitoria, aumento de la permeabilidad vascular, la extravasación de líquido y proteínas plasmáticas, así como el desplazamiento de leucocitos especialmente neutrófilos al foco inflamatorio, donde ayudan a eliminar las bacterias invasoras e inician el proceso de degradación de los tejidos necróticos (Aristil, 2010).

Manifestaciones clínicas visibles de la inflamación aguda

La inflamación aguda localizada, inicia con participación de efectores dependiente o independiente del sistema inmunitario y produce evidencia visible de su existencia. Celso, un autor romano del siglo I después de Cristo, describió a estas evidencias como los cuatro signos cardinales de la inflamación.

- *Rubor*: se refiere al color rojo del área involucrada en el proceso inflamatorio, y se debe al aumento de la circulación sanguínea y a la congestión vascular local.
- *Calor*: existe un aumento de la temperatura en el sitio de la inflamación como consecuencia de la irrigación sanguínea y aumento del metabolismo.
- *Tumor*: esto significa que hay un aumento de volumen o edema local por la congestión vascular y el aumento de las células que llegan al sitio de la inflamación.

- *Dolor*: el tejido inflamado edematoso ocasiona dolor localizado al sitio afectado por la irritación local de terminaciones nerviosas. Galeno añadió un quinto signo: pérdida de función (Salinas M. , 2011).

Manifestaciones sistémicas de la inflamación aguda

Además del aumento local de la temperatura, puede ocurrir el aumento de la temperatura corporal, mediante la liberación de pirógenos endógenos (IL-1, el TNF- α y la IL-6) producidos por los macrófagos. La leucocitosis es otro efecto sistémico de la inflamación aguda, que varía según la edad del enfermo y la extensión de la infección (Salinas M. , 2011).

Cuando existe una inflamación aguda se produce el aumento de proteínas que normalmente se encuentran en la sangre, pero en concentraciones muy bajas, conocidas como reactantes de fase aguda, como es en el caso de proteína C reactiva, el fibrinógeno y el componente C3 del sistema del complemento.

Proceso de la inflamación

Quimiotaxis: A través de este proceso los leucocitos alcanzan la zona de lesión. Las células se desplazan a lo largo de un gradiente de concentración de moléculas atrayentes como IL-8, C5a, histamina, leucotrieno, LPS, restos de fibrina o de colágena. Inicialmente se captan neutrófilos y posteriormente en un lapso de 24 a 72 horas, participan monocitos, fagocitos y linfocitos. Las células tisulares (cebadas, fibroblastos, queratinocitos, etc.) adyacentes a la zona infectada o lesionada son las primeras en llegar, en ser activadas y en promover la inflamación (Vega, 2008).

Aumento del diámetro vascular: Los cambios en el calibre de los vasos sanguíneos son inducidos por sustancias inflamatorias como la histamina, bradicinina, eicosanoides y la triptasa secretadas desde los primeros segundos de la inflamación por los mastocitos locales, basófilos y las células endoteliales activadas. Como consecuencia aumenta el flujo de sangre hacia el área inflamada, lo que genera la elevación de temperatura y enrojecimiento (calor y rubor) (Vega, 2008).

Aumento de la permeabilidad vascular: El efecto primario de la dilatación capilar es permitir el paso y la acumulación de líquido rico en proteínas (exudado) al tejido intersticial generando edema (tumor). En la zona afectada el estímulo que todo lo anterior ejerce y la acción de la bradiquinina sobre las terminaciones nerviosas, originan dolor. (Vega, 2008).

Adherencia y rodamiento celular: Los neutrófilos se unen a las células endoteliales a través de las moléculas de adherencia denominadas selectinas de baja afinidad. Los leucocitos se desplazan sobre las células endoteliales de las vénulas post-capilares mediante un mecanismo denominado rodamiento, la quimioquina IL-8 se adhieren a la superficie de los leucocitos en rodamiento, generando en ellas la adherencia y expresión de integrinas de alta afinidad; a su vez la IL-1 y el TNF- α actúan sobre las células endoteliales generando un aumento de la expresión de ligando (moléculas unidoras) e integrinas de los leucocitos con el propósito de lograr una unión firme entre ambas células (Vega, 2008).

Estimulación de la vía extrínseca de la coagulación: Los eventos señalados activan la vía extrínseca de la coagulación, de forma paralela se inicia la formación de fibrina y un estado pro-coagulante que impide la proliferación de gérmenes mediante la circulación sanguínea (Vega, 2008).

Transmigración o diapédesis celular: Mediante el proceso de rodamiento sobre las células endoteliales a través de las uniones intercelulares, los leucocitos llegan al tejido lesionado. En el proceso están implicadas ciertas moléculas de adhesión. Otro mecanismo de los leucocitos para llegar al tejido inflamado es pasar de manera trans-celular y para lograrlo, los neutrófilos extienden pseudópodos al interior de la célula endotelial y migran a través de sus poros; esta vía es guiada predominantemente por quimioquinas y señales quimioattractantes (Vega, 2008).

Las células en el sitio de la inflamación, fagocitan y endocitan al antígeno, lo procesan y lo convierten en péptidos pequeños, para luego enlazarlos a moléculas de MHC y ser presentados a los linfocitos T. De esta manera inician la participación de la inmunidad específica, que potencializa notablemente la respuesta inmune ante los agresores o causantes de la inflamación (Vega, 2008).

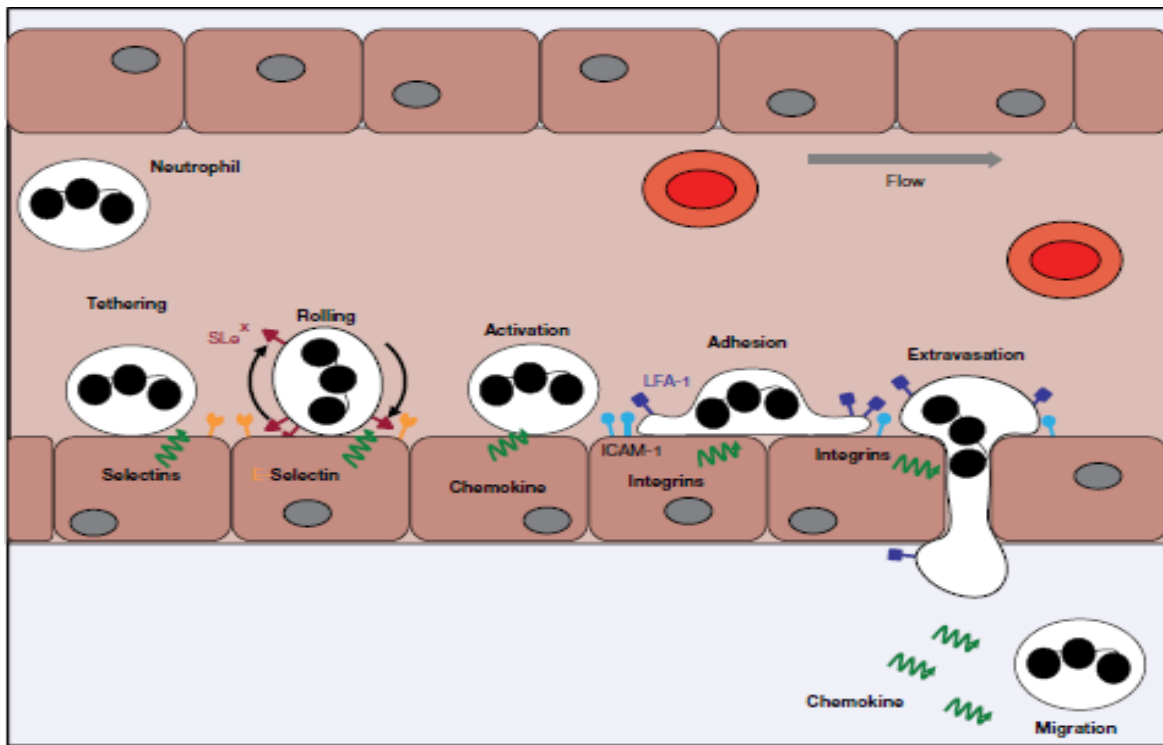


Figura 13. Los neutrófilos migran desde los vasos sanguíneos a los sitios de infección inducidos por los productos de los macrófagos y mastocitos activados, como IL-1, TNF, IL-8, e histamina. Los neutrófilos inicialmente se adhieren y ruedan a lo largo del endotelio a través de la P- y E- selectina. Los neutrófilos se activan, lo que lleva a la activación de integrinas de la superficie celular (LFA-1, CR3) que proporcionan una unión más firme a sus receptores afines (ICAMs) en el endotelio. Las últimas interacciones permiten a los neutrófilos detenerse en la pared endotelial y extravasarse a través de la membrana basal del endotelio y migran hacia el tejido dañado (Delves, Roitt, & Burton, 2011).

2.8.3 Inflamación crónica

La inflamación crónica es un tipo de inflamación de larga duración, semanas a meses que ocurre en el mismo tejido u órgano, puede llegar incluso a la destrucción de dicho tejido y la pérdida de su función. Las causas de la inflamación crónica son infecciones por agentes como las bacterias intracelulares, la presencia de enfermedades autoinmune, como artritis reumatoide o el Lupus Eritematoso Sistémico. En los tejidos con un proceso inflamatorio crónico, aunque puede ocurrir congestión vascular y edema, casi nunca son de la magnitud que presenta la inflamación aguda (Aristil, 2010).

La característica más significativa en la inflamación crónica es el predominio de leucocitos PMN, así como monocitos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, que la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos (Aristil, 2010).

Por lo general es una respuesta protectora que trata de restaurar los tejidos lesionados. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la intensidad o la repetición de la agresión provoca la pérdida del control local o la activación de mecanismos de la respuesta que están habitualmente quiescentes y que sobrepasan los sistemas de control, con una reacción sistémica exagerada que se denomina síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (Davies & toward, 1997).

2.9 Células y mediadores implicados en el proceso inflamatorio

2.9.1 Polimorfonucleares (PMNs)

En un proceso inflamatorio agudo y en respuesta a un estímulo quimiotáctico, el primer cambio observado es la llegada de los neutrófilos. Sus receptores de membrana le permiten unirse al endotelio vascular rodar y extravasarse por diapédesis al sitio de la inflamación. Los neutrófilos tienen funciones fagocíticas y microbicidas que permite el control de infecciones por diversos patógenos (Salinas M., 2011).

La fagocitosis en el neutrófilo está mediado por un gran número de receptores de superficie que reconocen PAMPs y la actividad microbicida está asociada a la presencia de gránulos que contienen enzimas proteolíticas como la elastasa, lisozimas, lactoferrina y la catepsina G. Los neutrófilos al igual que los macrófagos también pueden llevar a cabo los mecanismos microbicidas dependiente de oxígeno (estallido respiratorio) o del óxido nítrico para eliminar la infección (Salinas M. , 2011).

Las enzimas presentes en los gránulos de los PMNs actúan independiente del oxígeno, permitiendo así la digestión directa de las bacterias, se produce una licuefacción formada por células necróticas del individuo y PMN muertos que constituye el pus. Por otro lado, la liberación de especies reactivas de oxígeno, hidrolasas ácidas y otros productos lisosómicos provenientes de los PMN producen daño endotelial y estimulan la microcirculación lo que conduce a una activación adicional de la cascada inflamatoria (Salvill, Wyllie, Henson, Walport, & Henson, 1989).

2.9.2 Fagocitos mononucleares

Los monocitos constituyen la segunda población que participa en la inflamación, son atraídos por mecanismos similares a los de los PMN. Debido a su mayor tamaño, tienen más difícil y lenta su diapédesis a través de las paredes de los vasos, los monocitos pueden madurar a macrófagos en diferentes tejidos y recibir una variedad de nombres.

Los macrófagos maduros se caracterizan por expresar en su superficie celular el receptor para la porción Fc- γ de las inmunoglobulinas (Fc- γ R o CD16) y receptores de complemento (CR1, CR3). Además los macrófagos tienen receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs, *pattern recognition receptors*). Entre estos se encuentran los receptores de manosa y los TLRs (*toll-like receptors*). Cuando dichos receptores reconocen los PAMPs, se inicia una cascada de señales intracelulares que favorecen la internalización del patógeno por el macrófago hacia el citoplasma (Davies & Hagen, 1997).

Los macrófagos activados por los linfocitos Th2 para combatir patógenos extracelulares y parásitos desempeñan una función en la remodelación tisular así como funciones inmunoregulatoras en concordancia con el paradigma Th1 y Th2.

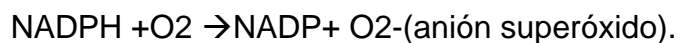
Con relación a los macrófagos tisulares, se diferencian dos tipos, macrófagos residentes y activados o inflamatorios: *Los macrófagos residentes* son aquellos que están presentes en un tejido determinado en condiciones de normalidad, *los macrófagos inflamatorios* están presentes en un tejido en respuesta a un estímulo exógeno. La diferencia entre ambos se basa en sus patrones de emigración bajo condiciones de inflamación (Bargallo, 2015).

Los macrófagos estimulados por mediadores producidos en los focos de inflamación, dejan de proliferar y pasan a activarse, para desarrollar sus funciones especializadas. En condiciones fisiológicas, el IFN- γ secretado por los linfocitos Th1 activados, es el principal agente activador de los macrófagos. Sin embargo, en condiciones patológicas tales como una infección bacteriana, el LPS también puede activar muchas de las funciones de los macrófagos. Por el contrario, en ausencia de estímulos, los macrófagos morirán por apoptosis. De esta forma se establece un balance entre la producción de precursores celulares en la médula ósea y la eliminación de la mayoría a nivel tisular (Bargallo, 2015).

Una vez que los macrófagos son atraídos al foco de la lesión, el microorganismo es endocitado, formando un fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma (que contiene enzimas hidrolíticas) para formar el fagolisosoma, es en este sitio donde se elimina al microorganismo ingerido por el ambiente extremo del pH.

También los macrófagos presentan mecanismos microbicidas dependiente de oxígeno (estallido respiratorio) donde se produce especies reactivas de oxígeno, y del óxido nítrico. Además, los macrófagos activados con LPS o citoquinas como IFN- γ , la IL-1 y el factor activador del complemento C5a sintetizan y liberan citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α) que favorecen el reclutamiento de PMN y amplifican el proceso inflamatorio. Además de la fagocitosis y la muerte intracelular los macrófagos actúan como CPA para las células B y T (Davies & Hagen, 1997).

Destrucción por especies reactivas de oxígeno (ERO): en la fagocitosis se produce un notable incremento en la actividad de la hexosa monofosfato, que genera menor cantidad del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Los electrones pasan desde NADPH a una flavoproteína de membrana que contiene flavina adenina dinucleótido (FAD) y luego a un citocromo (cit. b558) de la membrana citoplasmática, este tiene un potencial de óxido-reducción de punto medio, lo cual le permite reducir al oxígeno molecular a anión superóxido, por tanto la NADPH oxidasa que inicia la formación de ERO es la siguiente:



El anión superóxido se convierte en peróxido de hidrogeno bajo la influencia de la superóxido dismutasa y posteriormente en radical oxhidrilo (OH). Cada uno de estos productos tiene notable reactividad química, por lo cual son agentes antimicrobianos extraordinarios; en particular, el OH es uno de los radicales libres más reactivos. Si bien el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y los compuestos halogenados no son tan activos como los radicales libres, tienen más estabilidad y por ello se difunden mejor y en consecuencia, son tóxicos para los microorganismos en espacios extracelulares.

Destrucción por especies reactivas del nitrógeno: el NO surgió como un mediador fisiológico destacado cuando se demostró que era idéntico al factor de relajación derivado del endotelio formado por una óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en la mayoría de las células, pero sobre todo en macrófagos y neutrófilos, por lo cual crea un grandioso sistema antimicrobiano.

El NO puede actuar contra agentes que invaden el citosol; por lo tanto no sorprende que las células no fagocíticas, capaces de ser infectadas por virus y ciertos parásitos estén dotada de capacidad iNOS. El mecanismo de acción puede ser a través de la degradación de los grupos prostéticos Fe-S de determinadas enzimas transportadoras de electrones (Davies & Hagen, 1997).

2.10 Mediadores químicos de la inflamación

La activación de los PMN y macrófagos proporciona un ambiente de citoquinas (especialmente TNF- α e IL-1) y moléculas quimioatrayentes como los factores activadores del complemento (C3a y C5a), formil péptidos (como la formil-metionil-leucil-fenilalanina: FMLP y formil neoleucil-leucil-fenilalanina: FNLP) que actúan sobre el endotelio, el cual se activa y comienza la expresión de diversas moléculas y receptores en su superficie necesarias para que se produzca la adhesión y el paso de los leucocitos a través del endotelio vascular, así como la síntesis y secreción de citoquinas y mediadores inflamatorios.

Histamina

La histamina es mediador de la fase aguda y se encuentra almacenada en gránulos de células cebadas, basófilos y plaquetas, su liberación estimula la bradiquinina y las fracciones del complemento C3a y C5a, proteínas lisosomales y citoquinas como la IL-1, IL-8 (Alfonso, 2000).

Serotonina

La serotonina es un mediador vasoactivo preformado en el interior de las plaquetas. Su liberación es estimulada cuando estas se agregan tras el contacto con el colágeno, la trombina, el Adenosin Difosfato (ADP) y el complejo antígeno-anticuerpo (Alfonso, 2000).

Metabolitos del ácido araquidónico (AA)

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono, se obtiene a partir del ácido linoléico, el AA se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana celular y se libera por medio de fosfolipasas celulares que se activan mediante estímulos proinflamatorios, es el precursor más abundante de prostaglandinas, su liberación de esta estructura se produce como respuesta a un número diverso de estímulos físico, químico o mecánico (García, 2008).

Prostaglandinas (PG)

La producción de PG comienza con la liberación del AA por acción de la fosfolipasa A2, la expresión de esta enzima se incrementa con la activación del NF-kB (García, 2008). Las PG y los tromboxanos intervienen en la patogenia del dolor y la fiebre y se encuentran involucrados en el desarrollo del proceso inflamatorio.

Las prostaglandinas PGI₂ PGD₂ y PGE₂ son mediadores que generan un aumento del efecto vasodilatador de la histamina y la bradiquinina con lo cual potencian el edema. El leucotrieno B₄ provoca la agregación de PMN e induce su adhesión a células del endotelio vascular, comportándose como un potente quimiotáctico y el tromboxano A₂ promueve la agregación plaquetaria. (García, 2008)

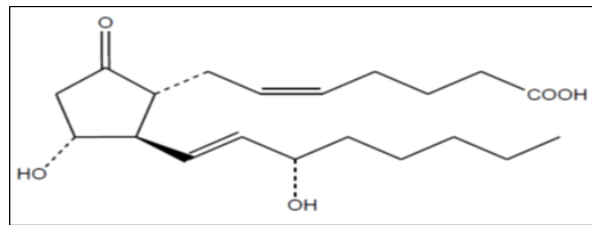


Figura 14. Estructura básica de la Prostaglandina E2

Fuente: (Martínez & Selva Rivas, 2005)

Leucotrienos

Los leucotrienos son eicosanoides derivados de lípidos de membrana, sintetizados a partir del AA por acción de la enzima 5 *lipoxigenasa*. Hay cuatro leucotrienos importantes: LTC₄, LTD₄, LTE₄ y LTB₄. El leucotrieno B₄ (LTB₄) se obtiene por hidrólisis enzimática del leucotrieno A (LTA) en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y queratinocitos. Los leucotrienos actúan como potente quimiotáctico activador de neutrófilos, estimula la adhesión de las células fagocíticas al endotelio (Fernández L. , 2008). El LTC₄ y el LTD₄ son potentes agentes quimiotácticos para los eosinófilos e inician la formación de radicales libres de oxígeno.

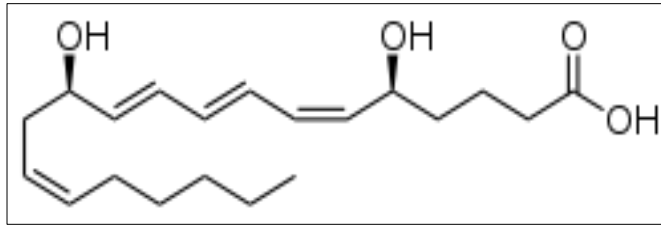


Figura 15. Estructura básica del Leucotrieno LTB₄

Fuente: (Martinez & Selva Rivas, 2005)

Lipoxinas

A diferencia de las prostaglandinas y leucotrienos, las lipoxinas presenta un efecto inhibitor de la inflamación mediante la reducción e incorporación de los leucocitos al foco inflamatorio, así como la reducción de la quimiotaxis de los neutrófilos y la adherencia al endotelio (Fernandez L. , 2008).

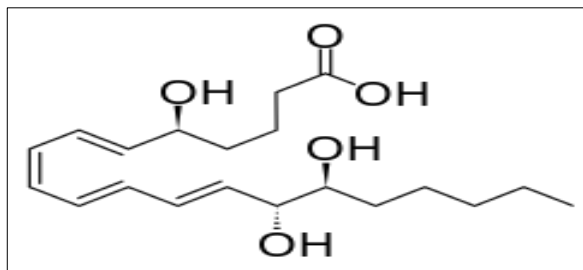


Figura 16: estructura básica de la Lipoxina B4

Fuente: (Martinez & Selva Rivas, 2005)

El factor activador de plaquetas (PAF)

Es un mediador proveniente de los fosfolípidos derivado de las células endoteliales, plaquetas, mastocitos, basófilos y neutrófilos. Sus efectos en la inflamación: induce la agregación plaquetaria, es un potente vasodilatador, aumenta la permeabilidad por contracción de las células endoteliales y es mil veces más potente que la histamina y la bradiquinina, estimula la adhesión leucocitaria y la síntesis de derivados del AA, PG y leucotrienos (García, 2008).

El óxido nítrico (NO)

El NO es un mediador que desempeña importantes funciones biológicas en procesos fisiológicos y patológicos en humanos, es producido por las células endoteliales, macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro, se origina a partir del grupo guanidino que se encuentra en la L-arginina por tres isoformas, de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS).

Las isoformas nNOS y eNOS producen de un modo constante bajos niveles de NO imprescindibles para numerosas funciones biológicas como la neurotransmisión, relajación de la musculatura lisa o mantenimiento de la homeostasis vascular. En cambio, iNOS se expresa como respuesta a varios estímulos inflamatorios (Moncada & Palmer 1992).

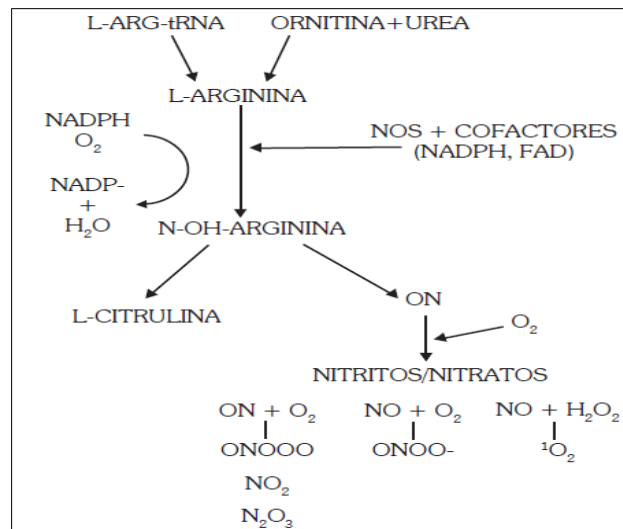


Figura 17. Síntesis del Óxido Nítrico. Se produce a partir de la L-arginina por la acción del NO sintetasa y algunos cofactores como el NADPH, FAD, FMN y tetrahipterina. En el caso de la NOS se requiere, además, la participación de la calmodulina y calcio para activarse (Gorocica, 1999).

La súper producción de NO por la sobreactividad de la enzima inducible iNOS, puede originar efectos indeseables en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias. La vida media y su acción biológica son muy cortas, ya que es rápidamente oxidado a nitrito (NO₂-) y nitrato (NO₃-). La acumulación de esta molécula está estrechamente relacionada a algunos eventos biológicos como el choque séptico, aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y cáncer (García, 2008).

El NO que producen los macrófagos a través de la óxido nítrico sintetasa (NOS₂) es activada por la inducción de citoquinas (IFN- γ y TNF- α), citoquinas inhibitoras de la (IL-4, IL-10, IL-13) producto de células Th1 o Th2, componentes microbianos y otros estímulos inmunológicos. El NO ingresa a las células e inactiva proteínas que participan en la producción de energía, transducción de señales y síntesis de ácidos nucleicos induciendo la muerte celular (García, 2008).

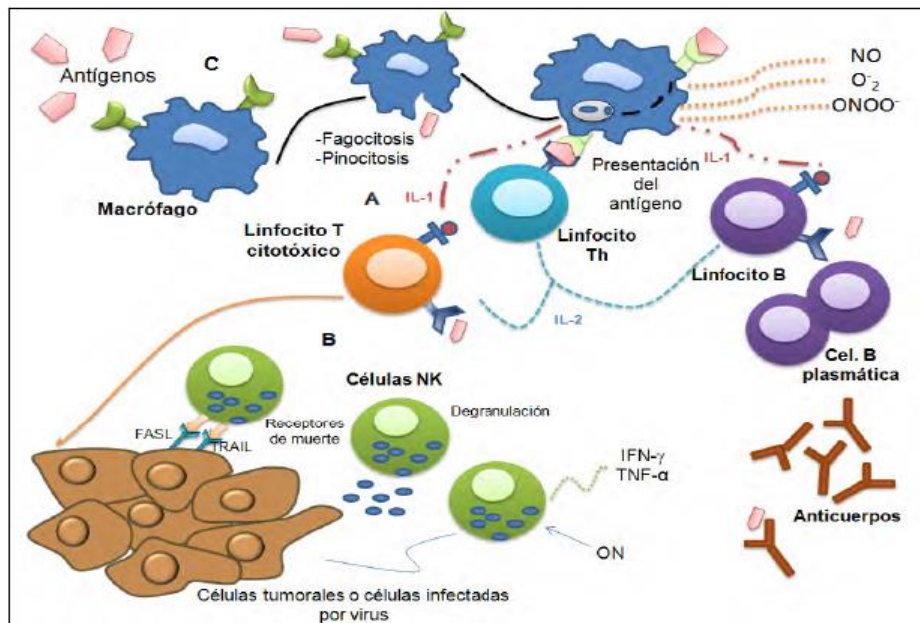


Figura 18. Los mecanismos moleculares y celulares de la inmunidad innata y adquirida participan para mantener la homeostasis y protección del huésped. Los LT y LB se caracterizan por su especificidad en reconocer determinados antígenos (A). Los linfocitos NK reconocen células tumorales y células infectadas con virus (B). Los macrófagos participan en la defensa antimicrobial por medio de la liberación de moléculas altamente tóxicas, su principal función efectora en la inmunidad innata es

fagocitar y sintetizar citoquinas que activan y reclutan a otras células inflamatorias (C) (Juarez, 2013).

2.11 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas secretadas por diversos tipos de células durante la fase de iniciación o en la fase efectora de la respuesta inmune/inflamatoria, actúan como mediadores intercelulares y ejerce su efecto mediante la activación de receptores específicos de membrana. Regulan la transcripción génica e inducen de esa manera el crecimiento celular, participan en el desarrollo de los procesos inflamatorios y su resolución, estimula la proliferación y apoptosis celular (Hamblin, 1993).

Diferentes citoquinas comparten o inducen los mismos cambios o acciones biológicas y en otros casos una misma citoquina actúa en diferentes tipos celulares o la misma citoquina es segregada por varios tipos de células, este fenómeno característico se denomina pleiotropía.

Las citoquinas tienen acciones proinflamatorias (Th1) y antiinflamatorias (Th2). Entre las proinflamatorias están las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, INF- α , INF β (interferón alfa y beta) y TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). Las citoquinas con acción antiinflamatorias son IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF- β . (Hamblin, 1993)

IL-1

La IL-1 es un miembro importante del grupo de las citoquinas proinflamatorio, regula la expresión de moléculas de adhesión, promueve la quimiotaxis y activa a los PMN, al igual que TNF- α , es importante en la reparación de las lesiones y es esencial para mantener una correcta inmunidad. Pertenece a una súper familia de citoquinas relacionadas que lleva su nombre, de las cuales se conocen tres agonistas (IL-1 α , IL-1 β e IL-18) y un antagonista del receptor (IL-1Ra). Las acciones biológicas de la IL-1 se basan en la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Santiago, 1995).

IL-6

Se trata de una citoquina que participa en múltiples procesos, por lo que se dice que es multifactorial o pleiotrópica. Entre sus funciones, se ha encontrado que actúa en la hematopoyesis, donde incrementa la proliferación del progenitor hematopoyético pluripotencial, participa en la respuesta de fase aguda de la inmunidad celular y en la regulación de los LT y LB. Además es considerada como una citoquina proinflamatoria inducida por LPS junto con TNF- α , IL-1, IL-6 y a menudo se utiliza como marcador de la activación sistémica de las citoquinas proinflamatorias (Barton, E 1997).

TNF- α

El TNF- α es una citoquina pleotrópica que posee propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales y que actúa en estrecha coordinación con otras citoquinas como la IL-1 y el IFN- γ . Además de su función inflamatoria y antitumoral se conoce su influencia en la mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares. (Tizard, 2002).

IL-10

La IL-10 una citoquina tardía, producida después de la liberación de los mediadores proinflamatorios, presenta propiedades antiinflamatorias, es secretada por la mayoría de leucocitos tras la estimulación celular con agonistas endógenos o exógenos, como el LPS o las catecolaminas (Tizard, 2002).

La IL-10 actúa en forma de homodímeros a través de un complejo de receptores transmembrana que se compone por IL10R1 e IL-10R2 y, en general, actúa mediante la activación de la quinasa Janus (Jak) 1 y la tirosina quinasa (TyK) 2, que activan los factores de transcripción de la familia STAT. En monocitos y macrófagos la IL-10 afecta tres funciones importantes: la presentación antigénica, inhibe la expresión del MHC II y de las moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86 y la liberación de mediadores inflamatorios en las células diana que han sido estimuladas por algunas citoquinas proinflamatorias, o la síntesis de COX-2, por otro lado potencia la liberación

de mediadores antiinflamatorios, como el antagonista del receptor de IL-1 β o de TNF- α (Waal Malefyt,199).

Interferón-gamma (IFN- γ)

Los interferones (IFN) son una clase importante de citoquinas inducidas por la infección viral o bacteriana. Los interferones de tipo 1 (IFN α e IFN β) son una familia de agentes antivirales. El grupo de IFN tipo II incluye al IFN- γ .

Función del IFN- γ

Actualmente se sabe que esta citoquina juega un papel crítico como modulador de la respuesta inmunitaria. Todas las células del organismo poseen receptores específicos para el IFN- γ lo que condiciona que esta citoquina tiene un efecto pleiotrópico sobre distintos tipos celulares. En los LT CD4+, estimula la proliferación de las células con subtipo Th1 y bloquea la de las Th2 favoreciendo aquellos procesos asociados a la respuesta inmunológica específica mediada por células. En los LB, promueve la diferenciación y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, además promueve la expresión de las moléculas de clase II del MHC (Boehm y col., 1997).

Los macrófagos responden al IFN- γ con el incremento de sus actividades microbidas y la producción de otras citoquinas como la IL-12, que tiene efecto sobre las células del sistema inmunitario adaptativo. La inducción de la síntesis de IL-2 representa un mecanismo de retroalimentación (feedback) positivo en el contexto de la inmunidad específica mediada por células, ya que esta citoquina actúa como un potente inductor de la generación y proliferación de linfocitos T CD4+ del subtipo Th1 (Boehm y col., 1997).

2.12 Actividad antioxidante

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos independientes que contienen uno o más electrones desapareados en los orbitales atómicos. Este electrón desapareado confiere a la molécula una alta reactividad con otras moléculas para aparear dicho electrón esto es la base de su toxicidad.

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (Halliwell & Gutteridge, 1989).

2.12.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO, hace referencia a aquellos radicales libres como: radical anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y las especies no radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno molecular (O_2) y NO (Servais & Koubi, 2003)

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, tanto en individuos sanos en etapas de crecimiento donde existe una mayor actividad metabólica o en situaciones en las que existe procesos inflamatorios donde se genera una demanda tisular de O_2 generando un desequilibrio por una producción excesiva de radicales libres o por una disminución de la capacidad antioxidante del organismo, produciendo daños oxidativos, este proceso es conocido como “estrés oxidativo” (Servais & Koubi, 2003).

2.12.2 Daño o estrés oxidativo

El oxígeno molecular (O_2) se encuentra en su forma más estable como estado tripleta (unión de dos átomos de oxígeno por medio de un enlace covalente triple) que le confiere menor reactividad. El "estrés oxidativo" puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante. Un incremento de la formación de ERO cuya alta reactividad puede generar: daño de la membrana celular, alteraciones en la estructura y función de células (González, 2009).

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Servais & Koubi, 2003).

Las principales fuentes de ERO son los leucocitos y las células endoteliales que liberan dicha sustancia al espacio extracelular tras la exposición a agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o estimulación fagocitaria, el proceso se lleva a través de la acción enzimática de NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio, la cadena de transporte electrónico, la descarga respiratoria de los fagocitos, la reacción de la xantina oxidasa y el sistema enzimático del citocromo P450 (Servais & Koubi, 2003).

Efectos nocivos de las ERO

Se ha relacionado el incremento de las ERO con la alteración de diferentes macromoléculas como los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados). Destrucción de las proteínas de la membrana ocasionando muerte celular con el aumento de la permeabilidad vascular, oxidan aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina consecuentemente se forma entrecruzamiento de cadenas peptídicas que impiden el desarrollo normal de sus funciones (transportadores iónicos de membrana, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc. (Halliwell & Gutteridge, 1989).

El incremento de las ERO eleva la activación del NF- κ B el cual es muy importante en la inflamación, debido al control que ejerce en la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- α , citoquinas, proteínas de la fase aguda, factores de crecimiento, y la expresión Cox-2, iNOS y la FLA₂ e intervienen como mediadores a través de la generación de sustancias quimiotácticas y la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (Fan, 2002).

Sistemas de defensa antioxidante

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan ERO, por lo tanto se requieren mecanismos de defensa que las neutralicen, a esta defensa se la denomina antioxidante y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre, el antioxidante, al reaccionar con un ERO le cede un

electrón, el cual anula la reactividad e inhibe la generación de radicales libres o se oxida a su vez y se transforma en ERO débil no tóxico (Valko, Leibfritz, & Moncola, 2007). En general, los sistemas antioxidantes se pueden clasificar en: hidrofílicos, hidrofóbicos, antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos y antioxidante hidrosoluble (Valko, Leibfritz, & Moncola, 2007).

2.12.3 Relación entre el estrés oxidativo y la inflamación.

Es conocida la relación que existe entre el estrés oxidativo y las enfermedades inflamatorias (Herencia *et al.*, 2001). La reacción inflamatoria se caracteriza por la hiperproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, agentes oxidantes que pueden desencadenar por sí solos una respuesta inflamatoria. Los antioxidantes como los polifenoles en muchas ocasiones presentan a su vez un efecto antiinflamatorio (Yoshimoto, 1983).

Es posible que los efectos farmacológicos de los antioxidantes estén relacionados con el metabolismo del NO. En primer lugar, los antioxidantes pueden preservar las funciones beneficiosas del NO, al captar directamente aniones superóxidos (Sichel, 1991) y por tanto impedir la interacción con el NO generado; en segundo lugar, los antioxidantes son capaces de inhibir la expresión de la iNOS (Camuesco, 2004); y por último, actúan como potentes captadores de radicales peroxinitrito (Flaenen, 1997). En consecuencia, los antioxidantes pueden prevenir los efectos perjudiciales generados por el NO en situaciones de inflamación.

3 ANTECEDENTES

El empleo de las plantas medicinales como una alternativa de tratamiento medicinal y farmacológico ha conllevado a un marcado y ascendente desarrollo de diversos estudios de plantas para el uso medicinal y se ha dado un enfoque particular a sus metabolitos secundarios que pueden presentar un alto potencial inmunomodulador.

Las plantas medicinales son consideradas como una de las formas más antiguas de tratamiento de diferentes dolencias. Algunas especies del género *Piper* de la familia Piperaceae fueron estudiadas ampliamente, de las cuales varias son utilizadas en la medicina tradicional como antiinflamatorio (Feio, Desmarchelier, & Gurni, 1996).

La especie *P. peltatum* es utilizada con diversos fines terapéuticos en regiones de la Amazonía peruana y boliviana. En el norte de La Paz, se la conoce popularmente como “sipusipu” y es utilizado como diurético, antipirético y como agente antiinflamatorio, (Alzamora & Et al, 2007).

En América Latina existen pocos estudios sobre la actividad antioxidante del género *Piper*. De 15 especies vegetales provenientes del Ecuador, en seis extractos se demostró actividad antiinflamatoria en un modelo *in vivo* inducido por carragenina y en tres extractos se determinó actividad antioxidante en modelos *in vitro*.

En Bolivia, algunas etnias utilizan plantas del género *Piper* como antiparasitario contra la malaria. Las especies *P. aduncum*, *P. leavilimum* y *P. rusbyi* presentan actividad leishmanicida y tripanocida contra especies como *L. amazonensis*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma cruzi*. Otras especies son *P. lanceolatum* y *P. callosum*, se usan en casos de Viruela y las hojas de *P. peltatum* se aplican en forma de cataplasma para ayudar en la inflamación (Flores, E., 2006)

Los diversos compuestos aislados de plantas del género *Piper*, compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides reportan actividad leishmanicida significativa. El extracto etanólico de *P. peltatum* presentó mayor actividad anti-leishmania con respecto a la fracción de hexano, IC50 de 27,1 µg/ml (Quiñones Dextre, 2018).

En las especies del género *Piper* también se identificaron aceites esenciales con actividad antimicrobiana, (hongos y bacterias) y antiprotozoarios, (*Leishmania* spp. *Plasmodium* spp. y *Trypanosoma* spp.), también se lo reporta como inhibidora de acetilcolinesterasa, como antiinflamatorio y con actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares melanómicas, gástricas y de mama, (Quiñones Dextre, 2018).

Bermúdez y col, el año 2017 demostraron estadísticamente que el extracto de hojas de *P. peltatum*, presenta una actividad antiinflamatoria moderada a 200 ppm con un porcentaje de inhibición inflamatoria de 67.56 +/- 0.46%; aunque inferior con la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico, 200 ppm) que presentó un porcentaje de inhibición inflamatorio de 73.13 +/- 0.35% y un IC₅₀ = 27.7 µg/ml y una actividad antioxidante no significativa, IC₅₀ de 3891.67 µg/ml.

También se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de *P. peltatum* a dosis de 1, 2 y 3 mg/kg de peso, mediante la técnica de inducción de edema plantar por carragenina al 0.05%, en ratas. Los datos fueron evaluados mediante una comparación de medias y análisis de varianza, del cual se determinó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y el grupo control (Muñoz M. A., 2014).

Emerson Silva y col. (2013) en un estudio sobre la actividad antioxidante y citotóxica del compuesto 4-nerolidilcatecol (4-NC) de *P. peltatum*, mostraron actividad antioxidante significativa mediante la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), sin embargo, el 4-NC mostro una mejor actividad citotóxico (IC₅₀= 31.4 µM). El 4-NC resulto ser más inestable que sus derivados perdiendo más del 80% de su actividad antioxidante tras el almacenamiento a -20 °C durante 30 días.

Se ha descrito la actividad citotóxica de la 4-NC mediante la inhibición del crecimiento *in vitro* de líneas celulares de melanoma y células de fibroblastos normales IC₅₀= 20-40 µM e IC₅₀= 50 µM, respectivamente. El 4-NC indujo la acumulación de proteínas ubiquitinas como Mcl-1 y actuó como inhibidor del proteasoma en las células de melanoma e inhibe a la topoisomerasa I humana, que se ha sugerido que es el mecanismo de la acción citotóxica de 4-NC en las células tumorales (Arroyo 2016)

Puertas y Benjamin el año (2009), respaldan el uso de *P. peltatum* en la medicina tradicional de Colombia y las regiones subtropicales de América del Sur; demostrando un potencial antioxidante de las fracciones que fue considerablemente más alto que el extracto crudo. Aunque todas las muestras evaluadas mostraron buena capacidad antioxidante frente a los métodos aplicados, la identificada como fracción 1 fue la más promisoría, inclusive más eficiente que el ácido ascórbico (inhibición radical DPPH: 75 y 68 %, respectivamente). Lo anterior permite proponer a *P. peltatum* como una fuente natural de fenoles con un alto uso potencial en la industria farmacéutica y de alimentos.

En un estudio realizado en las sustancias peltatol A, B, C a partir de extracto metanólico de *hojas de P. peltatum* de concentración 1 y 10 µg/ml, observaron la inhibición de la muerte celular inducida por VIH- (Moreira & Spitzer, 2000).

Las especies *P. tricuspe*, *P. peltatum*, *P. gorgonillense*, *P. multiplinervium*, *P. tuberculatum* y *P. Hispidum* fueron evaluadas como antibacterianos a partir de extracto etanólico de hojas mediante los métodos de dilución en placa de agar y difusión. Los resultados muestran que todas las especies presentan algún tipo de actividad en concentraciones de 40 mg/ml, excepto *P. tuberculatum*. (Pino, 2008)

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades inflamatorias en la actualidad representan uno de los problemas médicos más importante, muchas de estas son causadas por una activación descontrolada y continua de la respuesta inflamatoria que causa daño en los tejidos. Modular el sistema inmunitario mediante su estimulación o supresión puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud. La medicina tradicional se constituye en un hallazgo de moléculas (metabolitos secundarios) con capacidad de activar y controlar los mecanismos de defensa del huésped como una herramienta terapéutica adicional a los actuales tratamientos.

Otra característica de las enfermedades inflamatorias es la activación de oxidantes que son radicales que conducen a reacciones no controladas, resultando en daños oxidativos importantes en macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Halliwell, 1994). Los metabolitos secundarios presente en muchas especies vegetale con actividad antioxidante pueden disminuir el daño producido por los radicales libres.

La especie *P. peltatum*, continua siendo utilizado prácticamente como tratamiento para una variedad de enfermedades con procesos inflamatorios. Para determinar el papel de la planta en estudio como antiinflamatorio y antioxidante, en el presente estudio trabajamos con los EEP y EAP y evaluamos la capacidad de estimulación o supresión de mediadores inflamatorios que regulan el sistema inmunitario. Los resultados permitirán generar un respaldo científico sobre el uso tradicional de la planta.

5 JUSTIFICACIÓN

La inflamación se inicia como un mecanismo de defensa del organismo y se produce ante estímulos perjudiciales como factores mecánicos, físicos, químicos e inmunológico necesaria para la supervivencia (Salinas M. , 2011). Estudiar a la especie *P. peltatum* como una alternativa natural de tratamiento representaría una opción para el alivio de estos síntomas en diferentes enfermedades con proceso inflamatorio, la medicina tradicional desde tiempos ancestrales se caracteriza por presentar menor cantidad de efectos adversos contra algunos fármacos sintéticos comerciales, los cuales poseen una amplia gama de efectos colaterales que causan daño en la salud del paciente. Así mismo, la planta en estudio utilizada tradicionalmente como antiinflamatorio es de fácil accesibilidad principalmente para la población rural de escasos recursos.

Dentro de la familia *Piperaceae* se encuentran un abúndante número de especies, algunos de ellos, como el género *Piper* han sido reportados con actividad antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral e insecticida (Soto, 2015). Estudios realizados con moléculas como los flavonoides, fenoles, piperina, fitoesteroles, amidas y el 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Soto, 2015) han demostrado tener resultado importante combatiendo la inflamación y/o como inmunomoduladores de algunas enfermedades. Al describir las propiedades curativa de la planta, se debe considerar que las propiedades dependen de la región de cultivo, las condiciones del clima, fase vegetativa, entre otros factores, lo que conlleva a considerar un estudio en nuestro medio (Townsend, 2003).

En Bolivia la medicina tradicional representa una alternativa de tratamiento para diferentes enfermedades, la especie *P. peltatum* es utilizada tradicionalmente como antiinflamatorio. Sin embargo, existen escasas investigaciones de su efecto sobre el sistema inmunitario. Por tanto, es importante contribuir con investigaciones que permitan dilucidar si las propiedades curativas atribuidas por los pobladores son ciertas.

5.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cual es el papel de extractos de *P. peltatum* sobre la expresión de citoquinas inflamatorias en células mononucleares de sangre periférica humana y macrófagos murinos Raw-264.7?

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto antiinflamatorio y antioxidante de extractos de hojas de *P. peltatum* (sipusipu), “*in vitro*” en células mononucleares de sangre periférica humana y macrófagos murinos Raw-264.7

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de extractos de *P. peltatum* a la cual presenta citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica humana.
- Evaluar el efecto de extractos de *P. peltatum* sobre la proliferación celular.
- Determinar el efecto de extractos de *P. peltatum* sobre la producción de la citoquina IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica humana.
- Determinar el efecto de extractos de *P. peltatum* sobre la producción de la citoquina IL-10 en células mononucleares de sangre periférica humana.
- Determinar la actividad captadora de radicales libres del extracto de hojas de *P. peltatum*, mediante el ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*).
- Evaluar el efecto de extractos de *P. peltatum* en la producción óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño de la investigación

7.1.1 Lugar de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Seladis de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA.

7.1.2 Tipo del estudio

Experimental comparativo “*in vitro*”.

7.1.3 Muestra

Hojas de la especie de *Piper peltatum* (sipusipu).

7.1.4 Comprobación e identificación taxonómica del material vegetal

La comprobación e identificación taxonómica de las hojas de *P. peltatum* (Sipusipu), fue realizado en el herbario de la facultad de Biología de la UMSA, ver anexos.

7.1.5 Reactivo biológico:

En el estudio “*in vitro*” de la actividad antiinflamatoria y antioxidante se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC-humana) y la línea celular RAW 264.7. (Macrófagos murinos).

7.2 Materiales, reactivos y equipos

7.2.1 Materiales

- Jeringas 3, 5, 10 y 20 ml
- Tubos Falcón estériles de 5 y 50 ml (Becton Dickinson)
- Pipetas de plástico estériles de 5 y 10 ml (greiner bio-one)
- Pipetas Pasteur de vidrio 9” autoclavadas (WWR internacional)
- Placas de cultivo de 96 pozos, estériles (Becton Dickinson)
- Placas de ELISA de 96 pozos (Becton Dickinson)

- Micropipetas
- Propipeta automática
- Gradilla
- Filtros estériles de 20 mm de espesor

7.2.2 Reactivos

- Ficoll hipaque, densidad=1,077
- Medio de cultivo RPMI suplementado (SIGMA-ALDRICH)
- Medio de cultivo RPMI suplementado, sin rojo fenol (SIGMA-ALDRICH)
- Medio de cultivo DMEM suplementado (SIGMA-ALDRICH)
- Suero fetal bovino (GIBCO)
- Kit de MTT (Invitrogen)
- PBS celular, estéril
- PBS- tween
- Alcohol al 70 %
- Azul tripán 0,2 % (SIGMA)
- Fitohemaglutinina - FHA
- Lipopolisacarido LPS
- Kit de interferón- γ humano IFN- γ (Becton Dickinson)
- Kit de Interleuquina – 10 (IL-10) (Becton Dickinson)
- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) SIGMA
- Reactivo de Griess, SIGMA

7.2.3 Equipos

- Campana de flujo laminar (NUAIRE CLASS II)
- Microscopio (OLYMPUS)
- Microscopio invertido (OLYMPUS)
- Estufa de dióxido de carbono CO₂ (NUAIRE)
- Lector de ELISA
- Balanza analítica

7.1. PROCEDIMIENTO

7.1.1. Recolección del material vegetal

Las hojas de *P. peltatum* fue recolectada a una altitud que oscila entre 500 y los 1500 metros sobre el nivel del mar a temperatura promedio de 27°C en la provincia Sud Yungas - Municipio de Palos Blancos del Departamento de La Paz - Bolivia.



Figura 19. Recolección de las hojas de *Piper. peltatum*

Fuente: recolección propia

7.1.2. Limpieza y desinfección del material vegetal

El material vegetal recolectado se limpió y se descartaron aquellas hojas de aspecto físico deteriorado y que presentaban una coloración amarillenta. Las hojas fueron lavadas y secadas durante dos días bajo sombra a temperatura ambiente 25 ± 10 °C. Una vez seco, se molió en un mortero limpio para obtener partículas finas, el producto fue almacenado en frascos de vidrio en oscuridad hasta que se sometieran a extracción con etanol y agua.

7.2. Preparación de los extractos

7.2.1. Extracto etanólico de *P. peltatum* (EEP)

Por cada 25 gramos de material vegetal molido, se adicionó 250 ml de etanol al 96%. Se cubrió completamente de la luz y se dejó macerar por 48 horas a temperatura ambiente.

Concentración mediante rotavapor

Este procedimiento consiste en evaporar mediante una combinación de temperatura provista por un baño calefactor y la generación de presión de vacío. Se produce una rotación que aminora el peligro de ebullición y se acelera la evaporación mediante el aumento de la superficie de la solución.

Procedimiento

Después de la maceración se filtró y se colocó en un balón hasta la mitad de su capacidad. Una vez evaporado todo el solvente llegando a sequedad del extracto se retiró el balón del baño calefactor. El extracto contenido en el balón fue retirado en un frasco ámbar y conservado a -20°C para evitar la degradación de sus compuestos bioactivos.

7.2.2. Extracto acuoso de *P. peltatum* (EAP)

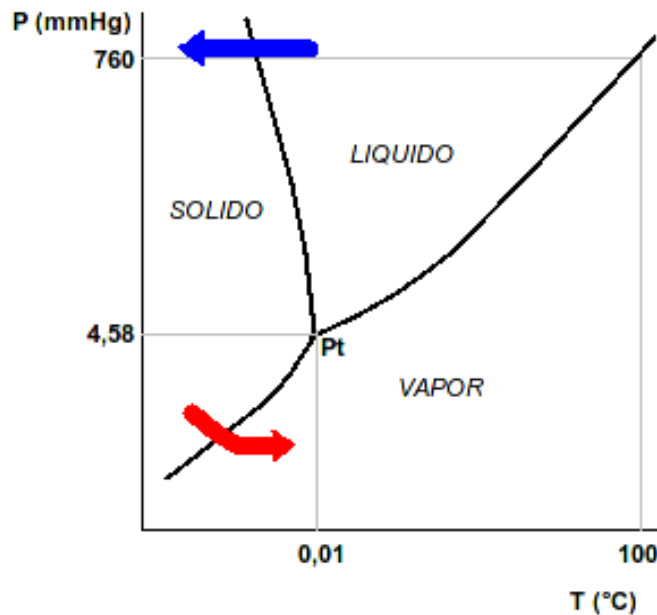
Por cada 25 gramos de material vegetal molido, se adicionó 250 ml de agua destilada. Se cubrió completamente de la luz y se dejó macerar por 48 horas a temperatura ambiente.

Método de liofilización

Según Voigt en 1982, describe que la liofilización se basa en el hecho de que el agua en estado de congelación, todavía tiene cierta presión de vapor y que, por tanto, puede ser separada del sistema por sublimación.

En el diagrama de fases del agua adjunto, se puede observar el punto triple del agua (0,01 °C; 4.58 Torr), para lo cual si se elige una presión inferior a 4.58 Torr, se puede comprobar que a temperaturas inferiores a 0.01 °C, se produce una transformación directa de la fase sólida en fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido, el hielo se sublima.

Figura 20. Diagrama de estado del agua



Fuente: (Voigt, 1982)

Procedimiento

Después de la maceración se filtró, se colocó aproximadamente 5 ml del material vegetal filtrado en frascos ámbar tapa rosca. Los frascos fueron llevados a -80°C para su congelación, el proceso de la liofilización tuvo un tiempo de duración de 20 a 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, para una mejor conservación de sus compuestos bioactivos, el extracto liofilizado se dejó a -20°C hasta su uso.

7.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC-humana)

Se tomaron 20 ml de sangre periférica de voluntarios (as), se agregó de inmediato ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) relación 1:10 a la jeringa. Posteriormente se trabajó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. La muestra de sangre se la diluyó con PBS, pH 7.4, 0.15 M., relación 1:1.

5 ml de la muestra fueron estratificadas sobre Ficoll Hypaque, densidad 1.077, se centrifugó 20 minutos a 1500 rpm.



Figura 21. Muestra diluida sobre Ficoll Hypaque.

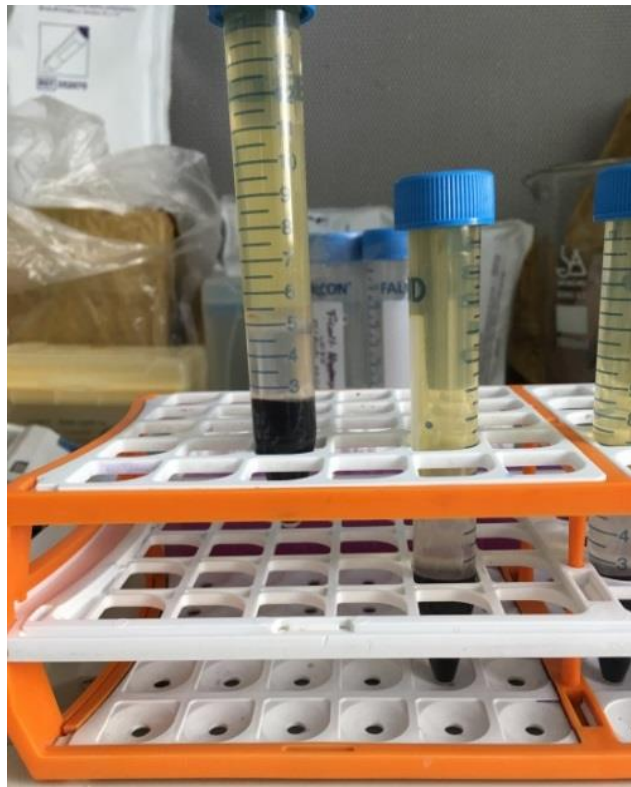


Figura 22. Muestra centrifugada con Ficoll Hypaque.

El halo de PBMC-humana fue separado en un tubo falcón estéril de 15 ml, el cual se volvió a centrifugar por 10 minutos a 800 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, el pellet se removi6 cuidadosamente y fue lavado con PBS pH 7.4, 0.15 M, por tres veces m6s. El pellet se resuspendi6 con 1 ml de medio de cultivo para realizar el ajuste celular correspondiente.

7.4. Ajuste de la densidad celular

A partir del recuento de c6lulas se ajust6 la densidad celular a $2,5 \times 10^6$ c6lulas/ml.

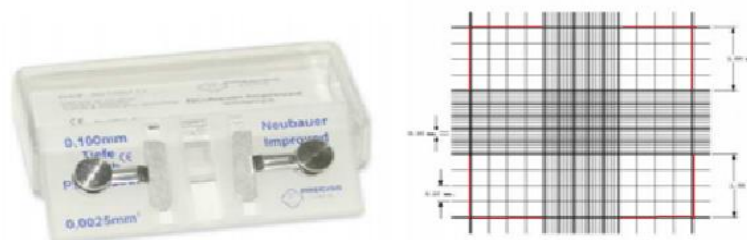


Figura 23. C6mara de Neubauer

7.5. Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se empleó azul tripán al 0.2%, colorante azoico que se utiliza para ensayos de viabilidad, el cual permite diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana, sin embargo, el colorante atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto las células muertas se muestran en un distintivo color azul.

Se observa de inmediato al microscopio con previa homogenización. Con el recuento de células realizado en la cámara de Neubauer, se calculó la densidad celular y luego se realizó el ajuste.

El recuento de las células se realizó en los retículos de conteo de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer, para determinar el porcentaje de viabilidad (para continuar con los experimentos se requiere de una viabilidad igual o mayor al 95%).

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de células vivas} = (N^\circ \text{ de células vivas} / N^\circ \text{ de células totales}) \times 100$$

Una vez que se ajustó la concentración de las células, se colocaron las PBMC-humana en policubetas de 96 pozos a una concentración de 2.5×10^6 células/ml por triplicado.

Para el cultivo de las células se empleó el medio (RPMI) SIGMA®, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS). Como control negativo (C-) se consideró solo células y el control positivo (C+) células estimuladas con fitohemaglutinina (FHA) a una concentración de 8 µg/ml. La concentración del EEP y EAP, a la cual no presentan citotoxicidad, fue determinado a partir de 1; 10; 25; 50 y 75 (µg/ml). Posteriormente se llevó a incubación durante 48 horas a 37 °C, una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

7.6. Test de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol MTT

Fundamento del método

Según José, (2013) la citotoxicidad es definida como la capacidad de ciertos compuestos de provocar una alteración en las funciones celulares básicas e induce daño en las células. El ensayo MTT es uno de los test más utilizados para estudios de citotoxicidad *in vitro*.

La técnica fue descrita por Mosmann en 1983 y se basa en el análisis de la actividad metabólica celular. La sal soluble de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) es transformada en cristales de formazán mediante la actividad de la enzima de la cadena respiratoria mitocondrial succinato-reductasa, esta enzima se encuentra únicamente activa en las células viables, los cristales azules de formazán no son insolubles en el agua, pero solubles en dimetil sulfoxido (DMSO). De manera que en el ensayo, el número de células vivas será directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

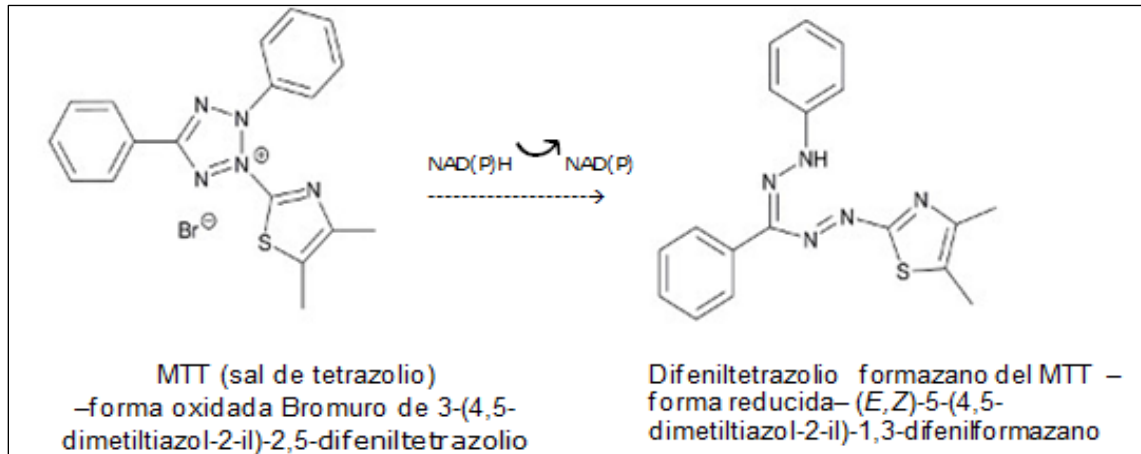


Figura 24. Reacción química de MTT (Aguilar 1996)

Procedimiento

La policubeta que contiene las células se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, luego las células se incubaron con una solución de 100 µl de RPMI sin rojo fenol y 10 µl de reactivo MTT a una concentración de 5 mg/ml durante 4 horas a 37°C. Durante

ese tiempo las células vivas, metabolizan el MTT transformándolos en pequeños cristales de formazán, gracias a la actividad enzimática de sus mitocondrias.

Posteriormente, se adicionó 100 µl de SDS para disolver el formazán y se incubó por 4 horas más, para luego leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm mediante lector de placas de Elis.

La absorbancia es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el cultivo. El valor obtenido de las células consideradas como control negativo se tomó como referencia (100% de viabilidad) a partir de él se calculó el % de viabilidad de las células expuestas a las distintas concentraciones de los extractos.

7.7. Evaluación de citoquinas en sobrenadantes de PBMC-humana

El análisis de los niveles de las citoquinas INF-γ e IL-10 en sobrenadantes de cultivo PBMC-humana se realizó mediante la técnica de ELISA tipo sándwich (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). OptEIA (BD Pharmingen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Procedimiento

Primero se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pozos con 100 µl en cada pozo de anticuerpo de captura de la IL-10 e IFN-γ el cual se diluyó con PBS pH 7.4, 0.15 M, se incubó a 4°C durante la noche. Luego se realizó el lavado con 300 µl de PBS tween, para posteriormente bloquear los pozos de la placa con 200 µl de buffer de bloqueo y se dejó por 1 hora a temperatura ambiente. Se procedió el lavado de la placa con PBS tween.

Se realizó una curva patrón, los estándares fueron diluidos en solución de dilución, PBS pH 7.4, 0.15 M, tween, 0.05 % para el IFN-γ (IFN-γ recombinante de ratón - BD Pharmingen) de concentración inicial del estándar de 25 ng/ml, los rangos fueron de 250 a 1,75 pg/ml. Para la cuantificación de la IL-10, de concentración inicial del estándar 41 ng/ml (IL-10 recombinante de ratón - BD Pharmingen), los rangos fueron

455.5 a 7,12 pg/ml. Luego se añadió 100 µl de la muestra a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas.

Se realizó nuevamente el lavado con PBS tween para añadir 100 µl de la solución de detección más la estreptovidina (anticuerpo de detección diluido en solución de dilución 1:125 para el IFN-γ y 1:50 para IL-10; estreptovidina diluida en solución de dilución 1:250 para el IFN-γ e IL-10), se incubó durante 1 hora. Las placas fueron nuevamente lavadas con PBS tween y se agregó a cada pozo 100 µl de sustrato (TMB) y se dejó actuar por 15 minutos en oscuridad. Se agregó 50 µl de solución de parada (ácido sulfúrico).

La absorbancia es proporcional a la concentración de las citoquinas obtenida a una longitud de onda de 450-630 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolan en una curva patrón a partir de titulaciones del estándar.

7.8. Determinación de la actividad antioxidante

La valoración de la capacidad antioxidante se basa en la determinación de la reducción del daño oxidativo producido por un agente oxidante a un sustrato oxidable. Dicha inhibición es directamente proporcional a la actividad antioxidante del compuesto que se valora.

7.9. Producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7

Fundamento del método

El NO es un gas inestable que origina otros productos como nitratos y nitritos. Para su valoración se suelen emplear métodos indirectos como el ensayo de Griess, que determina los productos estables de la oxidación del NO mediante la valoración colorimétrica de la concentración de nitritos (NO₂) obtenidos en el sobrenadante del cultivo celular (Weissman, 2001).

Griess en 1879 describió por primera vez un ensayo fundamentado en la reacción de diazotización a partir de naftiletildiamina y sulfanilamida, bajo condiciones ácidas, que da origen a un compuesto coloreado azóico. El reactivo de Griess está

compuesto por una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro y una solución de sulfanilamida. La sulfanilamida reacciona con los NO₂ en medio ácido y esto, seguido del acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, origina un complejo coloreado púrpura la cual presenta una rápida oxidación a nitritos adecuado para la determinación espectrofotométrica, permitiendo determinar de manera indirecta la producción de NO. (Miranda, 2001).

Procedimiento

Las células RAW 264.7, se sembraron a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Posteriormente las células se trataron con 1,10 y 25 µl/ml de EEP y 1,10 y 25 µl/ml de EAP más LPS 200 ng/ml, la policubeta que contiene a las células tratadas se llevó a incubación por 48 h a 37 °C una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

La acumulación de NO₂ se determinó mediante la mezcla de 50 µl del sobrenadante del medio de cultivo con igual cantidad del reactivo de Griess relación 1/1, durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Al término de la reacción se realizó la lectura a 540 nm, usando un lector de placas de Elisa. La concentración de NO₂ (µM) se obtuvo por interpolación en una curva estándar de NaNO₂ de concentraciones entre 1,756 y 100 µM.

Se consideró como control positivo a las células estimuladas con LPS, y las células sin LPS, EEP y EAP como control negativo. Los resultados se expresaron como % de concentración de NO₂ (µM).

7.10. Ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*)

Fundamento del método

Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó el reactivo de DPPH*. Éste método fue originalmente diseñado por Marsden Blois en 1958, y dentro de sus modificaciones posteriores destaca la de Brand-Williams 1995, que es el método utilizado en la actualidad.

La reacción química consiste en que el radical DPPH* sustrae un átomo de hidrogeno proveniente de un donador (compuesto químico puro o un extracto), producto de este cambio se desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo al disminuir la concentración del radical libre y presenta un máximo de absorbancia a 517 nm. (Molyneux, 2004).

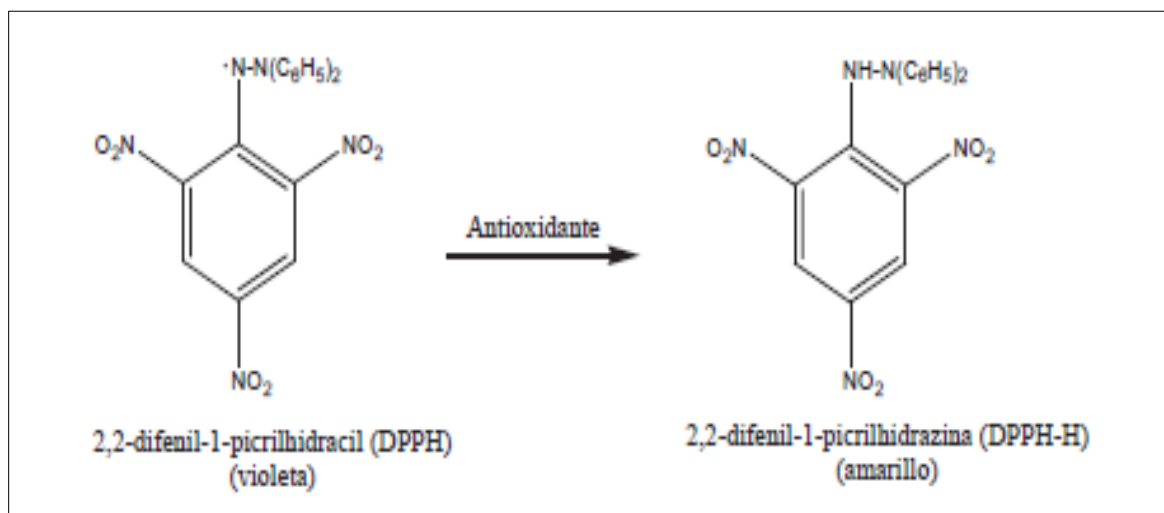


Figura 25. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2019)

Los resultados del ensayo DPPH* se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH* al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. (Deng, 2011).

Procedimiento

Para la preparación del radical DPPH*. Se disolvieron 2 mg de DPPH* Sigma-Aldrich en 100 ml de metanol grado analítico, posteriormente se dejó reposar hasta que el reactivo se estabilice a temperatura ambiente y conservado a 4°C en un frasco ámbar.

Se preparó una solución patrón de ácido ascórbico a diferentes concentraciones de 250 125 76 35 17 y 7 µg/ml para la elaboración de una curva de calibración. Ambos extractos fueron medidos por triplicado a diferentes concentraciones de 250 125 76 35 17 y 7 µg/ml, el mismo procedimiento se realizó para la sustancia patrón ácido ascórbico.

A 187,5 µl del radical DPPH* se añadió 62,5 µl de cada una de las diluciones de ácido ascórbico del extracto acuoso y etanólico, se mezcló y se dejó reposar en la oscuridad por 15 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de captación de radicales libres DPPH* se calculó en base a la siguiente ecuación (Molyneux, 2004).

$$\% \text{ de captación de DPPH} = \frac{(\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. Muestra})}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

El porcentaje de captación representa la pérdida del color purpura a amarillo del radical DPPH*, cuando se agrega un compuesto antioxidante, disminuye así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm de la desviación estándar (D.E). Las diferencias entre medias fueron evaluadas con la prueba T para dos muestras relacionadas a un nivel de confianza del 95%. Los datos estadísticamente significativos fueron representados como ($p \leq 0.05$), haciendo uso del programa SPSS versión 22.

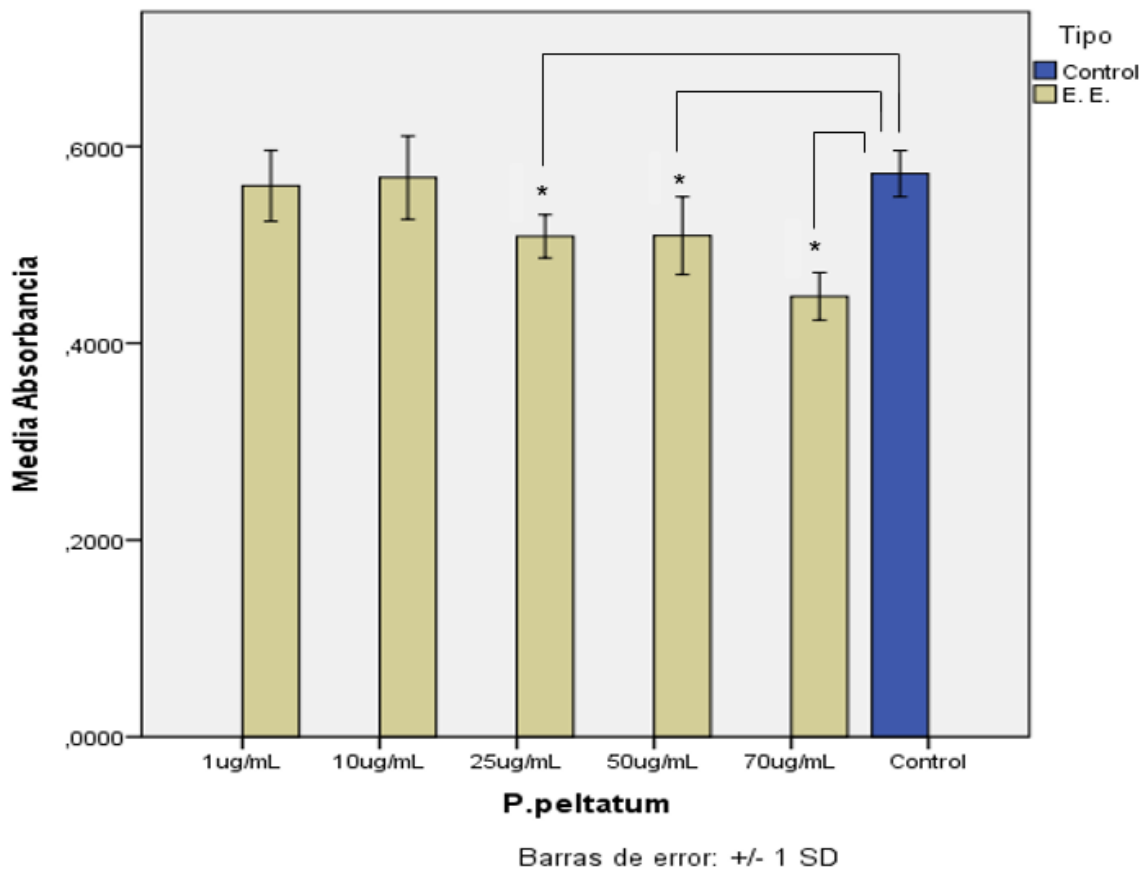
8. RESULTADOS

8.1. Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar el posible efecto tóxico del EEP y EAP sobre PBMC-humana, se incubaron las células durante 24 horas con diferentes concentraciones de ambos extractos. El porcentaje de viabilidad celular luego de ser tratada con diferentes concentraciones del EEP y EAP, se evaluó con respecto al control (solo células), valor que se tomó como 100% de viabilidad.

Efecto citotóxico del extracto etanólico de *P. peltatum* (EEP)

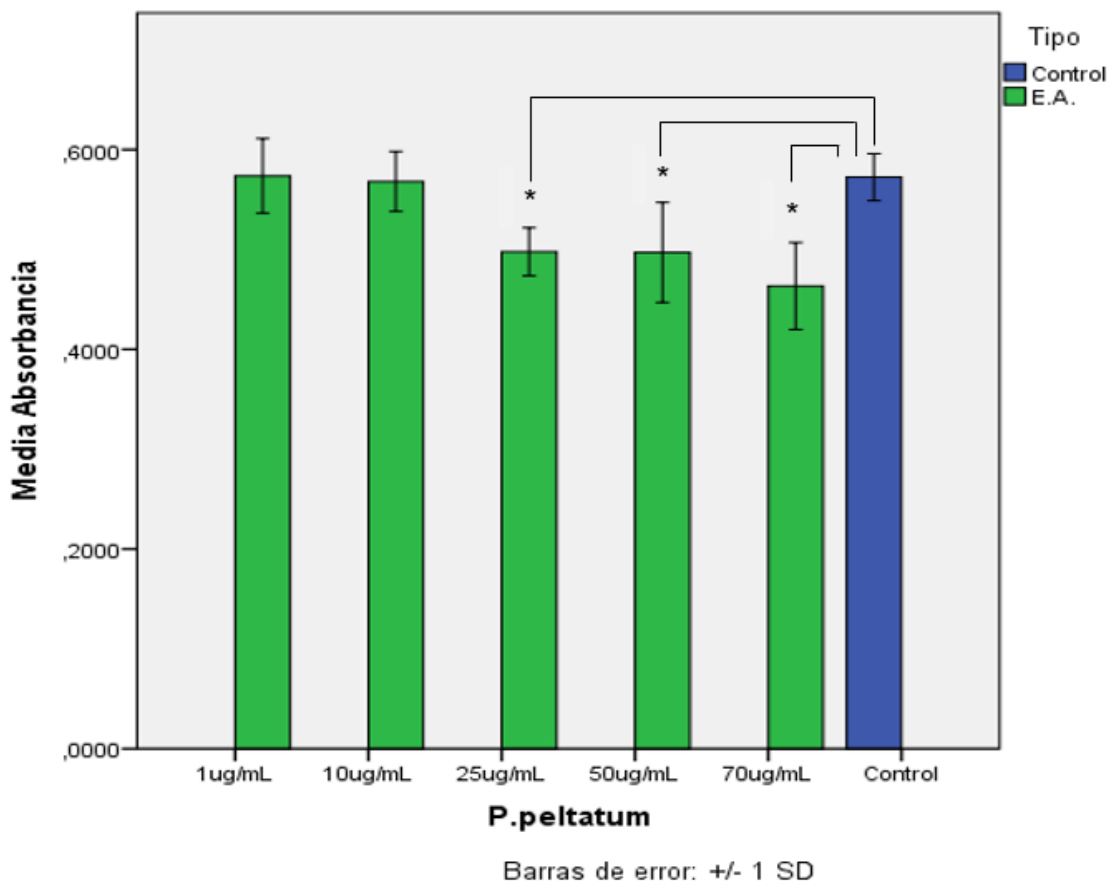
La viabilidad de las PBMC-humana que fueron expuestas a 25 µg/ml o más del EEP se vio afectada significativamente con relación al control (células vivas 84,2 %), ($p < 0.05$). Las concentraciones del extracto de 10 y 1 µg/ml, no presentaron ningún efecto toxico, manteniéndose vivas más del 90% de las células.



Gráfica 1. Actividad citotóxica del extracto etanólico en PBMC-humana. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significancia estadística, $p \leq 0.05$ respecto al control positivo). Se observa que concentraciones superiores a 10 µg/ml presentan citotoxicidad.

Efecto citotóxico del extracto acuoso de *P. peltatum* (EAP)

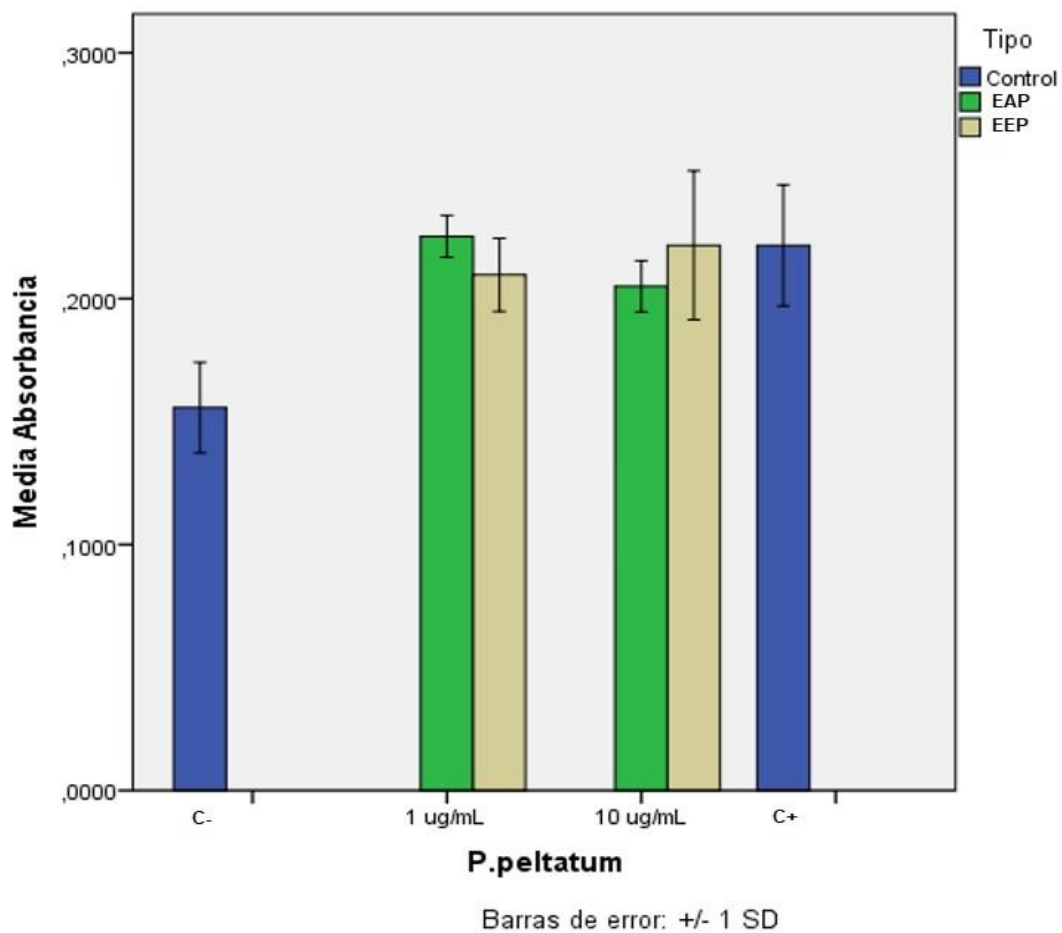
La viabilidad de las PBMC-humana que fueron expuestas a 25 µg/ml y concentraciones mayores del EAP, mostraron efecto citotóxico con un ($p < 0.05$) con relación al control. Las concentraciones del extracto de 10 y 1 µg/ml, no mostraron ningún efecto, manteniéndose vivas las células en porcentaje similar al control de células no tratadas.



Gráfica 2. Actividad citotóxica del extracto acuoso en PBMC-humana. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significación estadística $p \leq 0.05$ respecto al control positivo). Se observa que concentraciones superiores a 10 µg/ml presentan citotoxicidad.

8.2. Efecto del EEP y EAP sobre la proliferación en PBMC-humana

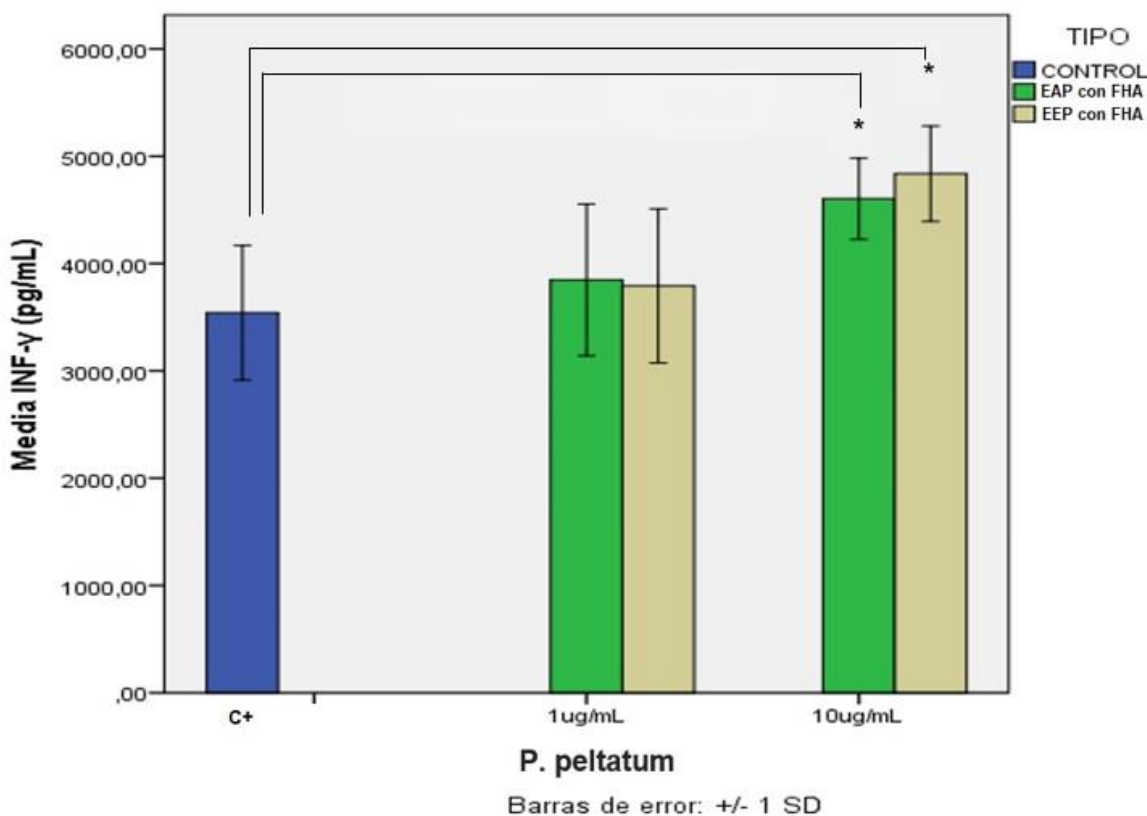
Para evaluar el valor terapéutico del EEP y EAP, fue importante analizar su efecto sobre PBMC-humana. Se analizó el efecto del EEP y EAP sobre la proliferación de células activadas con FHA, mediante el método MTT. Como se puede observar en la Figura 3, la proliferación celular a concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ del EEP y EAP no se vio afectado de manera significativa con respecto a las células estimuladas con FHA (control positivo).



Gráfica 3. Efecto del EEP y EAP Sobre la proliferación en PBMC-humana. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. Se observa que concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ no presentan ningún efecto tóxico sobre la proliferación celular.

8.3. Efecto del EEP y EAP en la producción del IFN- γ en PBMC-humana bajo el estímulo de fitohemaglutinina (FHA)

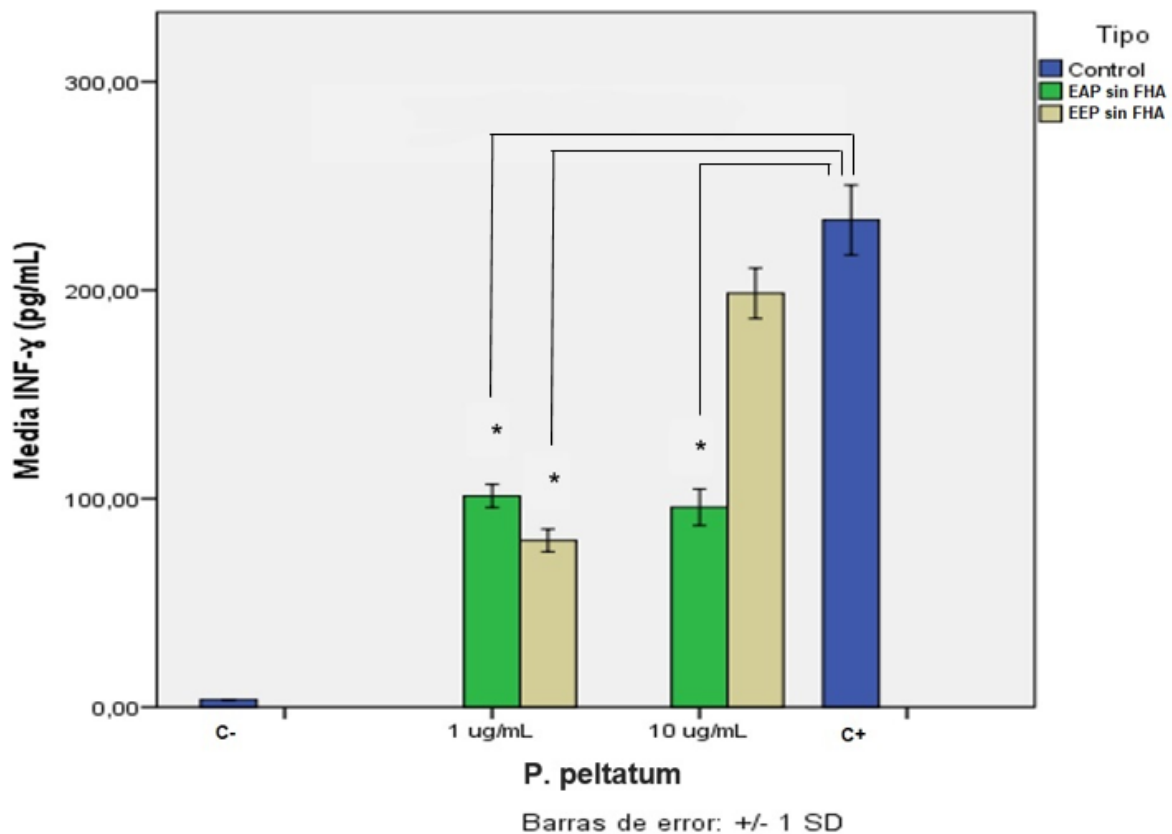
La activación de las células es importante ya que denota su capacidad de respuesta ante un estímulo, por lo que es vital averiguar el efecto de los extractos sobre la producción de IFN- γ por PBMC humana estimuladas con FHA. Como se puede observar, el EEP de concentración 10 $\mu\text{g/ml}$ indujo una marcada producción de IFN- γ , el efecto fue mayor en un 36,5% respecto al control positivo y 6,5% más que el EAP a la misma concentración como se observa en la gráfica 4. Ambos extractos EEP y EAP a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ no presentan efecto, comparados con el control.



Gráfica 4. Producción del IFN- γ en PBMC-humana estimuladas con FHA y tratadas con EEP y EAP. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significación estadística $p \leq 0,05$ respecto al control positivo). Se muestra que los EEP y EAP estimulan la producción de IFN- γ a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

8.4. Efecto del EEP y EAP en la producción del IFN- γ en PBMC-humana sin estímulo.

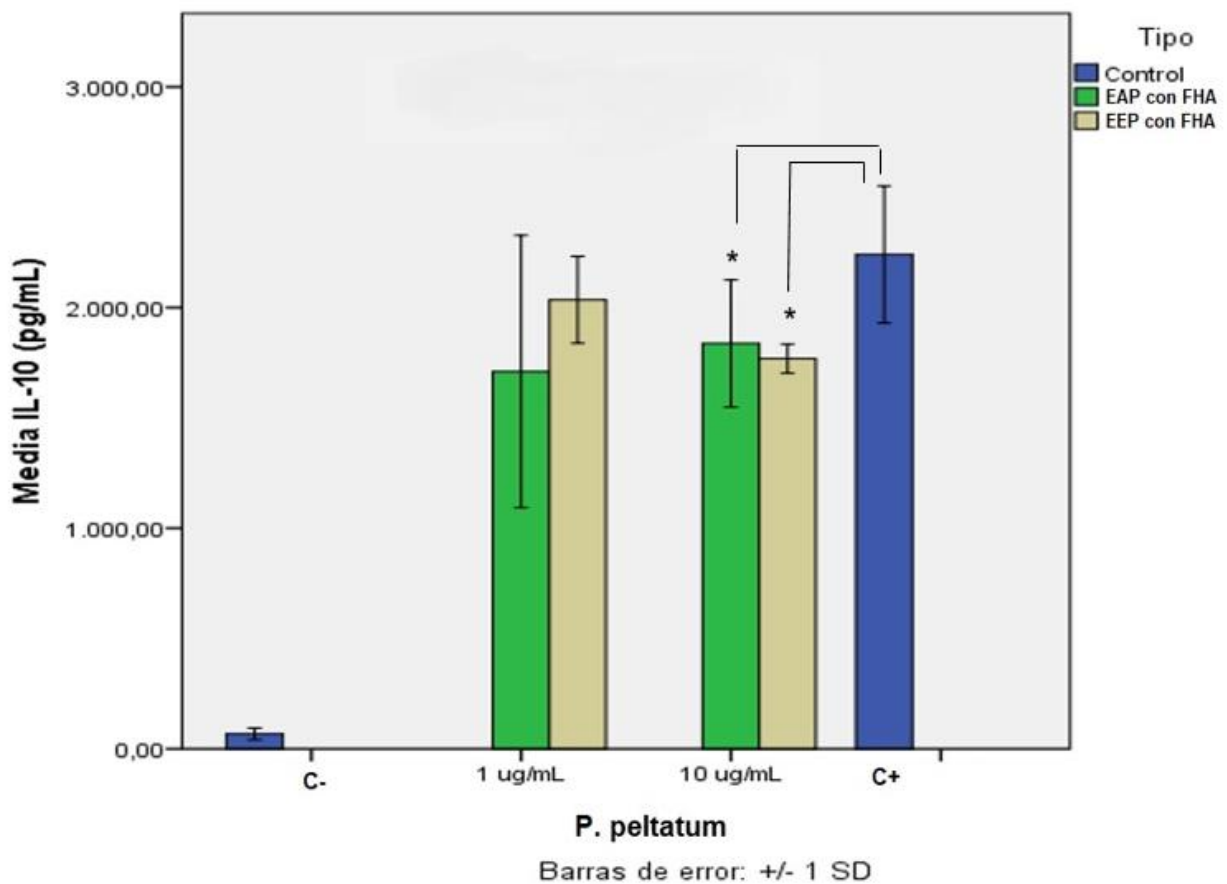
En la gráfica 5, se muestra el efecto estimulante del EEP a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ a través de un marcado incremento en la producción de IFN- γ similar al control positivo (células estimuladas) y 83,5 % más que el control negativo (solo células). Sin embargo 1 $\mu\text{g/ml}$ del EEP no presenta el mismo efecto. Por otra parte el EAP a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ no muestran esa capacidad de estimular al IFN- γ .



Grafica 5. Producción de IFN- γ sólo en PBMC-humana y tratadas con EEP y EAP. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significación estadística $p \leq 0.05$ respecto al control positivo). El EEP muestra una fuerte capacidad de estimulación de la producción de IFN- γ con respecto al control negativo y similar al control positivo.

8.5. Efecto del EEP y EAP en la producción de la IL-10 en PBMC-humana bajo el estímulo de FHA.

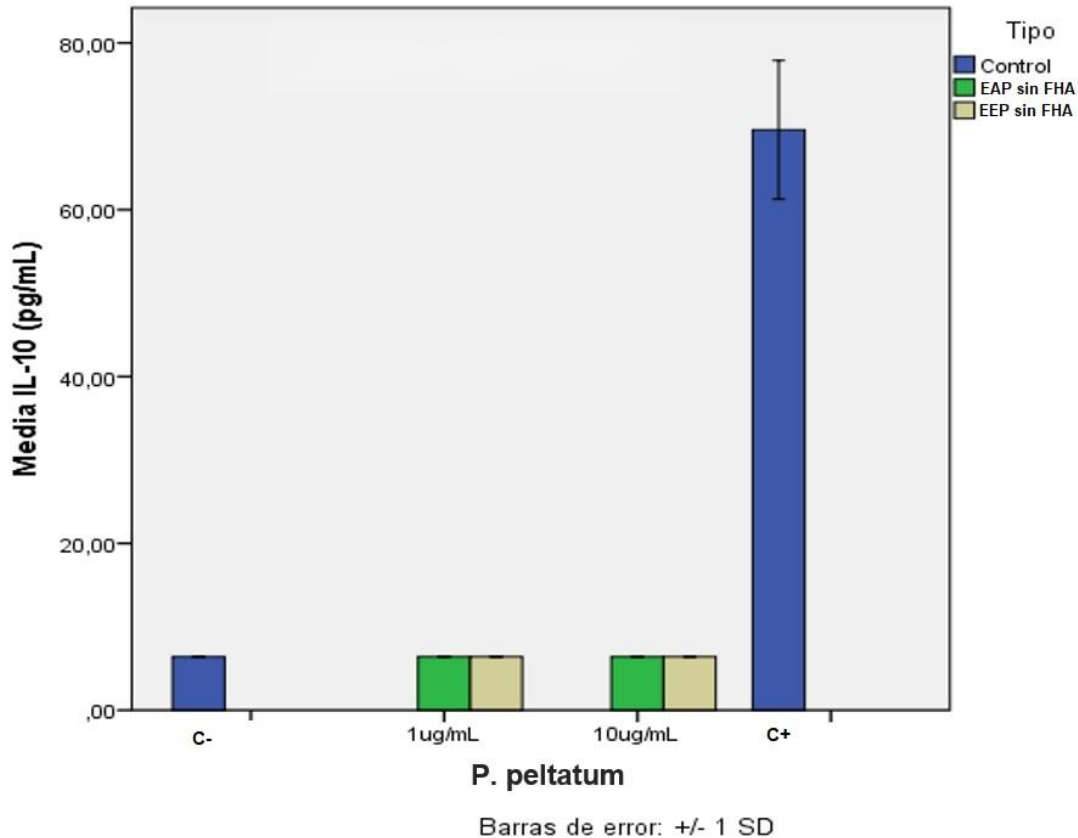
Al presentar un fuerte efecto sobre la producción de IFN- γ , es importante saber si los extractos tienen efecto sobre la producción de la IL-10 por PBMC-humana estimuladas con FHA. En la gráfica se observa que el EEP y EAP a 10 $\mu\text{g/ml}$ presentan un efecto inhibitor en un porcentaje de 21% y 18% respectivamente con relación al control positivo ($p \leq 0.05$). Por otro lado el EEP a 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibió solo el 9% y el EAP a la misma concentración presenta gran dispersión de los datos.



Grafica 6. Producción de la IL-10 en PBMC-humana estimuladas con FHA tratadas con EEP y EAP. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significación estadística $p \leq 0.05$ respecto al control positivo). Se observa que el EEP y EAP inhiben la producción de la IL-10 con respecto al control positivo.

8.6. Efecto del EEP y EAP en la producción de la IL-10 en PBMC-humana sin estímulo.

En la gráfica 7, se puede observar que el EE y EA de 1 y 10 µg/ml en sobrenadantes de PBMC-humana no presenta ningún efecto sobre la concentración de la IL-10 con respecto al control negativo (células sin estímulo), ($p>0.05$).

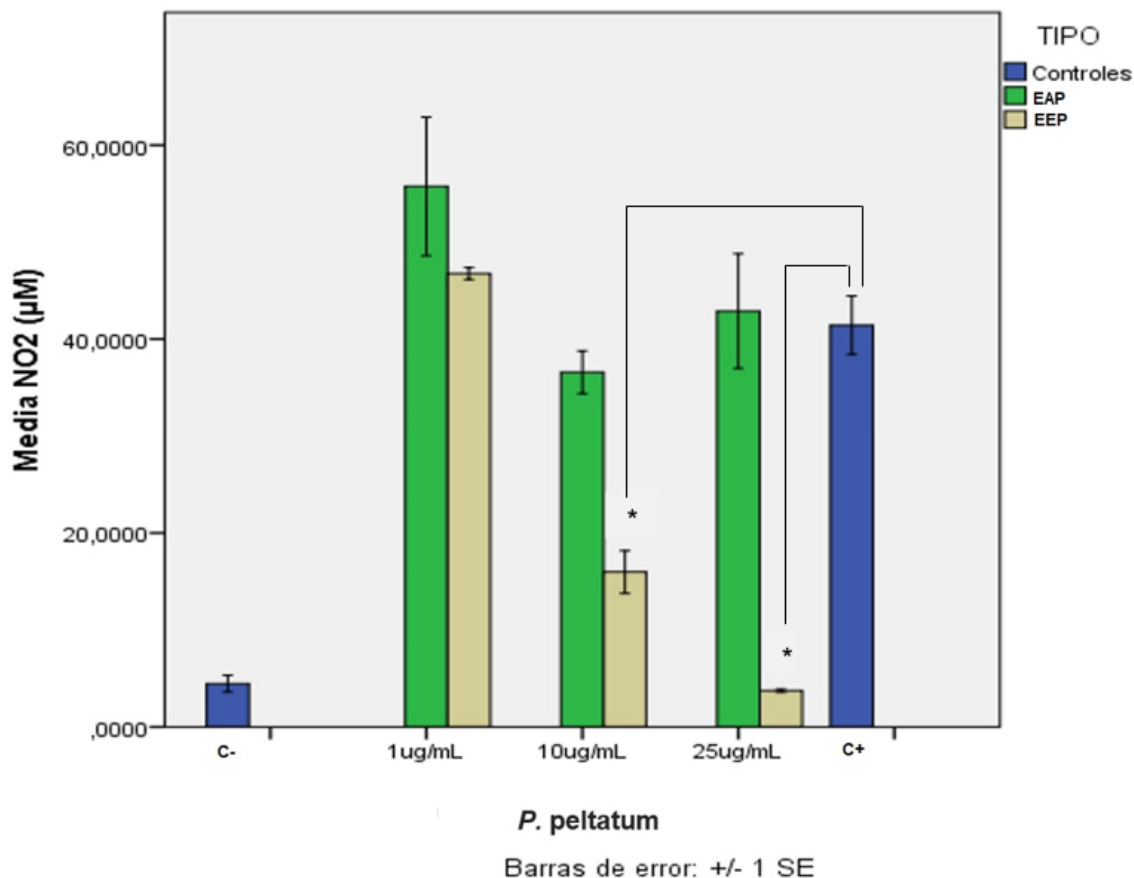


Grafica 7. Producción de la IL-10 en PBMC-humana sin estímulo y tratadas con EEP y EAP. Los resultados se expresan como medias y desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. Se observa que células no estimuladas previamente con FHA, no responden a ningún efecto del EEP y EAP.

8.7. Efecto de los extractos sobre la producción del óxido nítrico (NO)

La producción de NO por macrófagos se determinó mediante la reacción de Griess por medio de la cantidad total de NO₂ obtenidos en el sobrenadante del cultivo celular (Green, 1987). Evaluamos los efectos de 1, 10 y 25 µg/ml del EEP y EAP sobre macrófagos murinos Raw 264.7 incubadas durante 48 horas en presencia y ausencia de LPS 250 ng/ml.

En la gráfica 8 los resultados demuestran que la producción de NO en células activadas con LPS (control positivo) fue evidente con relación a células sin tratar (41,4 µM y 4,47µM de NO₂ respectivamente) ($p < 0.05$). El tratamiento de las células con el EEP de 10 µg/ml activadas con LPS indujo una reducción del 61,4% y con y 25 µg/ml se indujo una reducción del 90,9% lo que muestra un potente efecto inhibitor de la producción de NO respecto al control positivo 100 % µM de NO₂. Por otro lado el EAP de 10 y 25 µg/ml no tuvo un efecto inhibitor significativo sobre la producción de NO. El extracto acuoso a 1 µg/ml muestra un aumento en la producción de NO, sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa, ($p=0.08$).



Grafica 8. Efecto del EEP y EAP sobre la producción de nitritos totales por macrófagos murinos Raw 264.7 activadas con LPS. Los resultados se expresan respecto a las células estimuladas con LPS (100% de producción de NO) y se presentan como medias de un mínimo de tres experimentos independientes. *(Indica significación estadística $p \leq 0.05$ respecto al control positivo). Las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ del EEP presentan fuerte capacidad inhibitoria de la producción de NO con respecto al control positivo. Se observa también que el EEP de 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ presenta una marcada inhibición de la producción de NO respecto al EAP a las mismas concentraciones. *(Indica significación estadística $p \leq 0.05$ respecto al EAP).

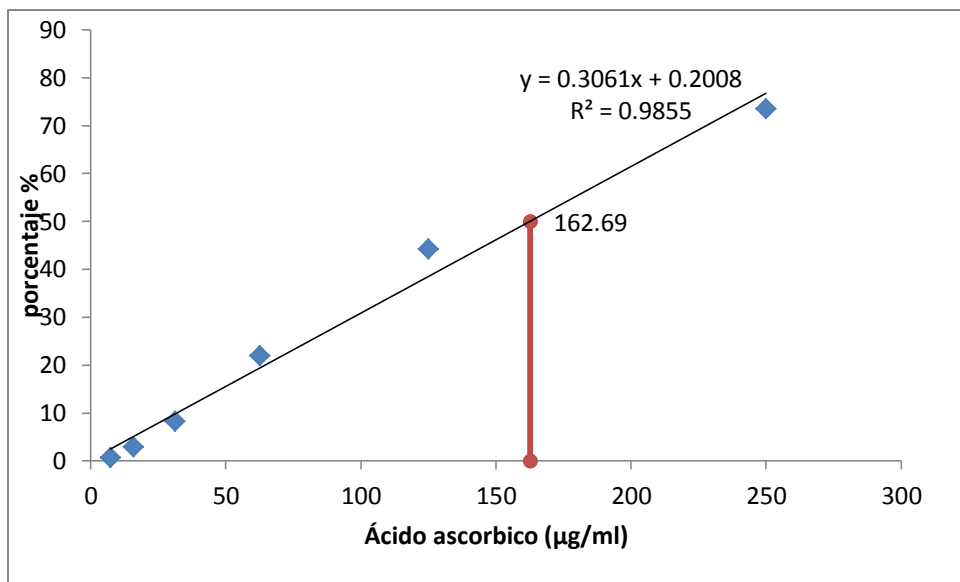
8.8. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante *in vitro* del EEP y EAP se evaluaron por el método de inhibición del DPPH el cual reporta sus resultados como IC50 o también denominada concentración inhibitoria, es decir, la concentración efectiva del antioxidante necesaria para inhibir la concentración inicial de DPPH en un 50 %.

Se realizó la curva del Ácido ascórbico como estándar de comparación de la actividad antioxidante con los EEP y EAP.

Tabla 1. Resultados de la curva estándar y actividad antioxidante de ácido ascórbico.

Concentración del ácido ascórbico µg/ml	% de captación de radicales libres
250	73.7
125	44.2
62.5	21.9
31.25	8.3
15.75	3.0
7.875	0.7



Gráfica 9. Curva de la concentración inhibitoria media del ácido ascórbico en la actividad antioxidante.

Se observa que el ácido ascórbico a una concentración media de 162.7 µg/ml es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres IC50 (concentración que el extracto necesita para inhibir al 50%).

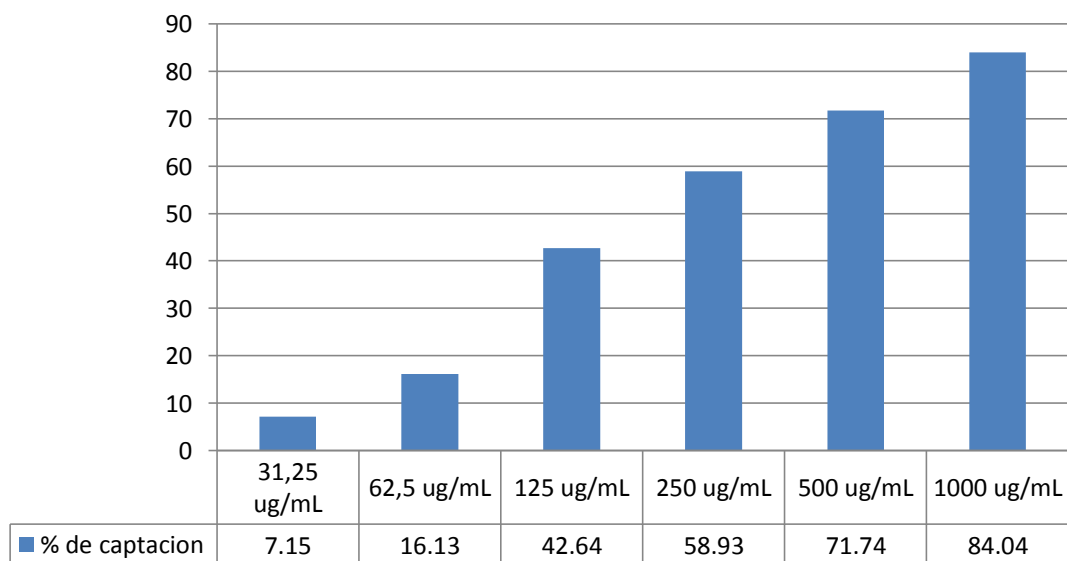
Actividad antioxidante del extracto etanólico de *P. peltatum*

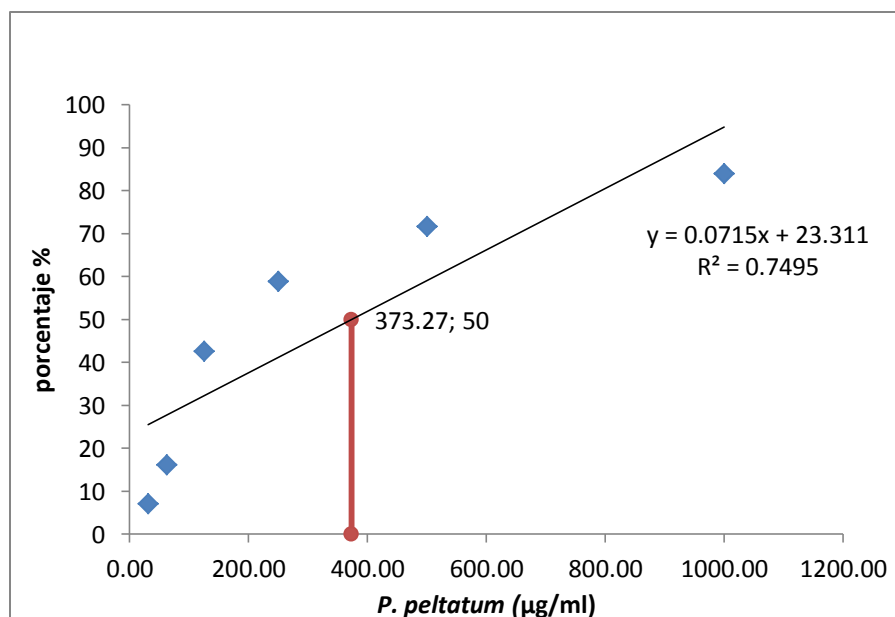
Para determinar la actividad antioxidante del EEP se midió el porcentaje de captación de radicales libres a diferentes concentraciones de los extractos como se observa en la Gráfica 10.

Tabla 2. Resultados de la actividad Antioxidante del EEP.

Concentración del EEP (µg/ml)	% de captación de radicales libres
1000	84
500	71,7
250	58,9
125	42,6
62,5	16,1
31,25	7,1

Gráfica 10. Porcentaje de Captación de radicales a diferentes concentraciones del EEP.





Gráfica 11. Curva de la concentración inhibitoria media del EEP en la actividad antioxidante.

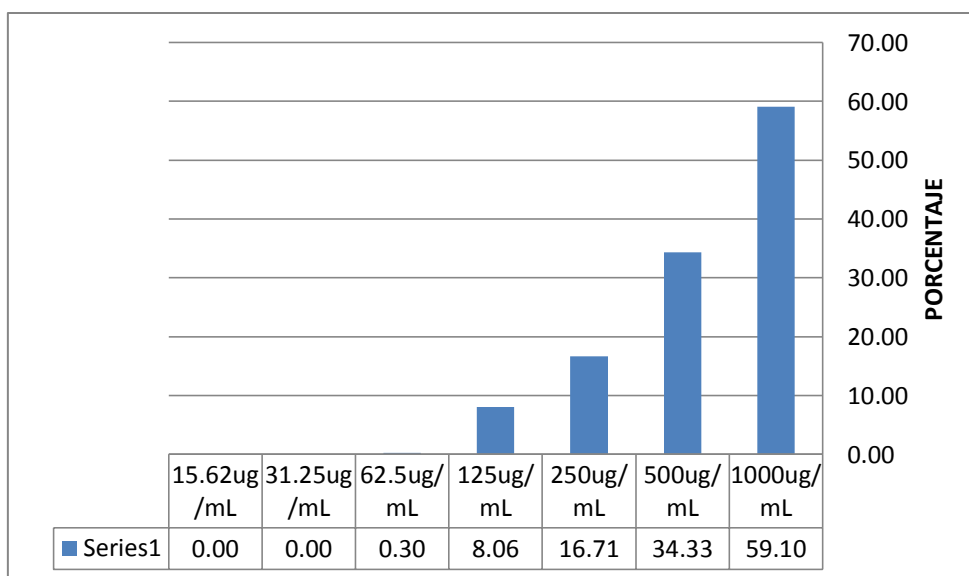
Se observa que el extracto etanólico, a una concentración media de 373,27 µg/ml es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres IC50 (concentración que el extracto necesita para inhibir al 50%).

Actividad antioxidante del extracto acuoso de *P. peltatum*.

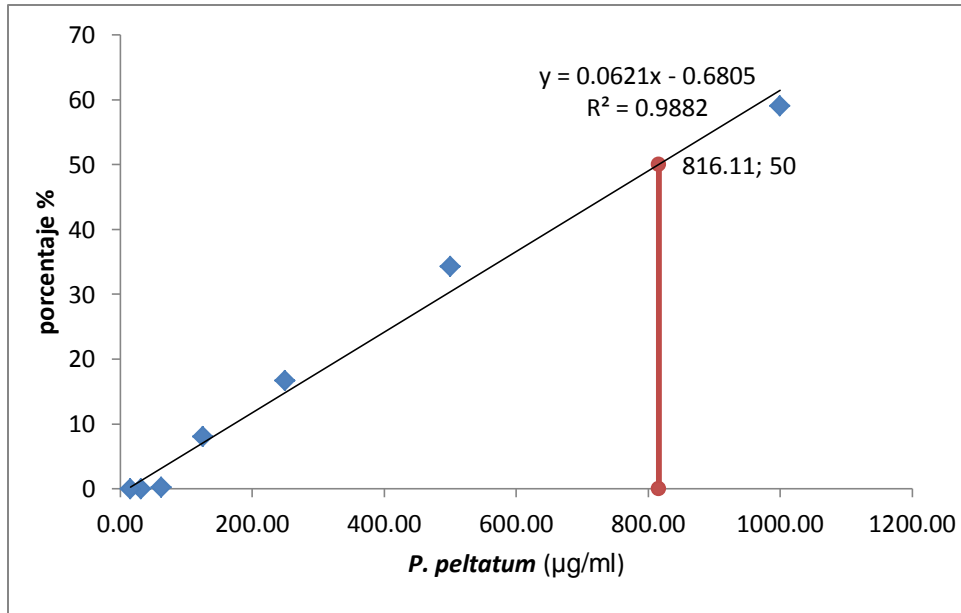
Para determinar la actividad antioxidante del EAP, se midió el porcentaje de captación de radicales libres a diferentes concentraciones de los extractos como se observa en la Gráfica 12.

Tabla 3. Actividad Antioxidante del EAP.

Concentración del EAP ($\mu\text{g/ml}$)	% de captación de radicales libres
1000	59,1
500	34,3
250	16,7
125	8,1
62,5	0,3
31,25	0,3
15,62	0,07



Gráfica 12. Porcentaje de captación de radicales a diferentes concentraciones del EAP.



Gráfica 13. Curva de la concentración inhibitoria media del EAP en la actividad antioxidante.

Se observa que el EAP a una concentración media de 816,11 µg/ml es capaz de neutralizar el 50% de radicales libres IC₅₀ (concentración que el extracto necesita para inhibir al 50%).

9. DISCUSIÓN

La especie *P. peltatum* ha sido utilizada en la medicina tradicional por presentar actividad antioxidante (Puertas & Benjamin, 2009); es una especie con muchos usos medicinales en diferentes regiones del mundo y se ha comprobado que los extractos y sus compuestos bioactivos, tienen actividad antiinflamatoria, diurética, antipirética, analgésica y antioxidante (Soto, 2015) (Desmarchelie & Ralentización, 2000). Por su amplio uso tradicional se evaluó el efecto antiinflamatorio y antioxidante de los EEP y EAP en PBMC-humana y el efecto sobre el óxido nítrico en macrófagos murinos Raw 264.7.

Al iniciar los estudios para conocer más sobre sus efectos en la respuesta inmunitaria, se analizó su posible efecto citotóxico mediante la determinación de la viabilidad de las células, luego de 24 horas de incubación en presencia de diferentes concentraciones de los EEP y EAP. Las concentraciones de 1 y 10 µg/ml no presentan ningún efecto sobre las células. El extracto acuoso de concentración 10 µg/ml causa una leve reducción en la proliferación celular, sin embargo, el efecto no es significativo con relación a las células estimuladas con FHA ($p= 0.4$). En tanto los EEP y EAP a concentraciones de 1 y 10 µg/ml no afectaron la viabilidad y la proliferación, se utilizaron estas dos concentraciones en los posteriores experimentos.

Los extractos vegetales empleados en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas afecciones en las que interviene el sistema inmunitario, constituye un punto de partida para la búsqueda de compuestos inmunomoduladores, La polarización de los linfocitos T ya sea hacia una respuesta Th1 secretoras de interferón γ (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) o hacia una respuesta Th2 que liberan IL- 4 e IL-13 en respuesta a antígenos que activan a las células del sistema inmunitario innato. Los diferentes tipos de células colaboradoras se inactivan mutuamente, de modo que los TH1 (a través del IFN- γ) inhiben selectivamente la actividad de los TH2 y los TH17. A su vez, los TH2 inhiben la proliferación de los TH1 y los TH17 mediante la IL- 10 y la IL- 4 por lo tanto es de interés averiguar si los extractos de *P. peltatum*, podrían inducir o inhibir la producción de estas moléculas en PBMC-humana.

En caso de una respuesta inmune inflamatoria las células (linfocitos) se activan, al activarse liberan mediadores y también proliferan. Al tratarse de una planta con efecto sobre la inflamación, se requiere estimular a las células para simular el proceso inflamatorio, aunque de manera parcial. Por esta razón se estimuló a las PBMC humana con FHA, un mitógeno policlonal que se comporta en forma análoga a las células estimuladas por antígenos.

Los resultados mostraron que la concentración de 10 µg/ml del extracto etanólico de *P. peltatum* presenta un efecto de mayor intensidad sobre la producción de IFN-γ por PBMC-humana activadas con FHA, con relación EAP. Por otro lado, se observa que en las células no activadas con FHA y a la misma concentración del extracto 10 µg/ml no se observa efecto sobre la proliferación celular (datos no mostrados) pero si observa un fuerte estímulo sobre la producción de IFN-γ. Al no observarse una estimulación significativa de la proliferación celular, sugiere que los extractos de *P. peltatum* no actuarían sobre los factores involucrados en la proliferación celular, como la IL-2 que es una de las citoquinas más importante con ese efecto y como estimulante de otras células del sistema inmune. Ambas citoquinas son producidas por células Th1. Sin embargo, se ha observado que estímulos que aumentan la producción de IFN-γ en cultivo celular, no aumentan la de IL-2 o incluso la inhiben y que la inducción de la proliferación celular puede manifestarse sin la producción de IFN-γ (H, Arase, & Saito., 1996). De tal forma que la producción de IFN-γ y proliferación linfocitaria pueden ocurrir con relativa independencia.

Los compuestos fenólicos podrían estimular la producción de IFN-γ por medio de la estimulación de IL-12 (Magrone & Candore, 2008), los flavonoides también tienen actividad sobre la producción de esta citoquina (Chavez & col, 2018). Los extractos de *P. peltatum* presentarían actividad inmunomoduladora sobre la subpoblación de linfocitos CD4+ Th1, la cual promueven la respuesta inmunitaria celular a través de la producción de IFN-γ. No se tiene reportes anteriores del efecto sobre la producción del IFN-γ y por qué vía de señalización actúa, por lo que este resultado serviría como precedente para futuras investigaciones sobre la composición diferencial de los constituyentes con actividad inmunomoduladora.

Como consecuencia del incremento de IFN- γ se observó que los extractos etanólico y acuoso de *P. peltatum* a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron significativamente la concentración de IL-10 en células activadas previamente con FHA, en contraste con las células no activadas que no mostraron ningún efecto al ser expuestas a los extractos. Al ser inhibida la IL-10 sus funciones como potente antiinflamatorio, inmunosupresor y clave en la regulación del sistema Inmunitario es neutralizada, contrastando con resultados publicados por (Bermúdez, 2017) quien reporta una actividad antiinflamatoria, mediante la reducción de sales de tetrazolio a compuestos de formazan en neutrófilos aislados demostrando la inhibición de la inflamación.

La diferencia entre nuestros resultados y los de Bermúdez, (2017) podría deberse también al activador de células utilizado PHA. Los linfocitos y posiblemente los monocitos son las células afectadas por la PHA, mediante su transformación a un estado en el cual son capaces de dividirse. Las células polimorfonucleadas (PMN) no parecen formar parte de la población celular que inicia la división posteriormente a la acción de la PHA, originando efectos diferentes en la producción de citoquinas. Por otra parte la composición del extracto podría ser otro factor importante, ya que al ser un extracto crudo no se pudo determinar la actividad por los diferentes componentes que contiene la planta en estudio. En otros estudios, se han reportado que plantas con propiedades antiinflamatorias pueden presentar efectos inmunomoduladores (Yamada, 1991), explicando de esa manera los datos publicados sobre la actividad del principal componente natural, 4-Nerolidil catecol como antiinflamatoria y antioxidante (Nuñez & Castro, 2005) y actividad antitumoral *in vitro* (Pinto, 2006).

Los macrófagos son células efectoras de la respuesta inmunitaria innata y se encuentran involucradas en el inicio y la posterior regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son el IFN- γ , partículas de LPS e incluso se ha demostrado que componentes de extractos vegetales presentan esta capacidad.

Los organismos en condiciones normales producen óxido nítrico en cantidades traza para el mantenimiento de un óptimo estado de salud. Sin embargo, en un proceso inflamatorio generalizado se produce una sobre producción de óxido nítrico que

actuaría como microbicida debido a que genera peroxinitritos como consecuencia de la inducción de la enzima iNOS por su reacción con radicales libre de oxígeno ejerciendo un efecto tóxico para distintos tipos celulares.

De esta manera consideramos importante evaluar la actividad de extractos de *P. peltatum* sobre la liberación de óxido nítrico. El EEP de 10 y 25 µg/ml mostró un efecto antagónico al LPS al reducir 63% y 90,5 % el NO respectivamente, este efecto del EEP deja entrever un posible efecto antiinflamatorio. Se observa un efecto contrario con la menor concentración del EAP que incrementó la producción de NO. sin embargo son datos estadísticamente no significativos. Debemos considerar que los EEP y EAP presentan un cocktail de metabolitos secundarios, que pueden estar actuando de manera sinérgica o antagónica, en los diferentes procesos.

Existen diferentes estudios que mencionan efectos sobre la actividad antioxidante de la especie *P. peltatum* y se han aislado y caracterizado un gran número de metabolitos secundarios, algunos con similitud estructural a sustancias antioxidantes de origen sintético. Por lo que en este estudio se evaluó la actividad antioxidante de los extractos en estudio. Se observó que el EEP presenta mayor actividad antioxidante que el EAP, el IC₅₀ obtenido es de 373,27 µg/ml y 816,11 respectivamente y al poseer un IC₅₀ bajo, se necesita una menor concentración del extracto para inhibir el 50% del radical (DPPH). Estos datos concuerdan con la literatura donde existen varios estudios que señalan que los extractos orgánicos polares tienen de 3 a 4 veces más fenoles que los extractos acuosos (Moreno, 2006; Brunet, 2006). Esto quiere decir que el extracto acuoso, generalmente tendrá una menor actividad antioxidante que los extractos orgánicos polares, también puede ser debido a que los compuestos activos presentes en los extractos acuosos pueden ser atenuados por otros componentes de la mezcla.

En contraste con nuestros resultados, otros estudios determinaron la actividad antioxidante de extracto hexano crudo de hojas de *P. peltatum* (DPPH), obteniendo como resultado un IC₅₀ ≤ 200 mg de extracto/µmol de DPPH. (Puertas & Mejía, 2009). Sin embargo en un estudio realizado por Bermúdez (2017) se determinó que el IC₅₀ del extracto hidroalcohólico de *P. peltatum* de 3891,67 µg/ml. La principal

diferencia entre los resultados podría deberse a múltiples factores como: las diversas condiciones en que se efectuaron los estudios, factores (climáticos, atmosféricos, topográficos y edáficos), como también a la parte de la planta que se utilizó en la investigación, las condiciones climáticas de crecimiento y la extracción de metabolitos (Soto, 2015).

A pesar que se observó que *P.peltatum* presenta actividad antioxidante, al realizar un análisis de correlación entre la concentración citotóxica, la concentración que se requiere, tanto del EEP y EAP, para lograr un porcentaje de inhibición del 50% de radicales libres es significativamente mayor a la que se determinó, por lo que no se considera un antioxidante.

10. CONCLUSIONES

- Este estudio mostró que el extracto etanólico y acuoso de hojas de *P. peltatum* no presentan un efecto citotóxico sobre las PBMC humana a concentración menor o igual a 10 µg/ml utilizando la técnica de MTT.
- Se evaluó el efecto de los extractos etanólico y acuoso de *P. peltatum*, sobre la proliferación celular encontrándose efectos no significativo con relación al control positivo.
- Los extractos etanólico y acuoso de *P. peltatum* presentan un efecto inmunomodulador, a través de la estimulación de la respuesta inmunitaria al promover significativamente la producción de IFN-γ en PBMC humana estimuladas con FHA y células no estimuladas, mostrando una tendencia dosis-dependiente.
- Los extractos etanólico y acuoso de *P. peltatum* inhiben la producción de la IL-10 en células estimuladas. Sin embargo, no presenta ningún efecto sobre células que no fueron estimuladas previamente con FHA.
- Los extractos de *P. peltatum* mostraron efecto inhibitorio sobre la producción de óxido nítrico en presencia de LPS en macrófagos RAW 264.7 por el método de Griess.
- Los datos que se presentan en este estudio sobre la actividad antioxidante, sugieren que ambos extractos en estudio de *P. peltatum* no poseen capacidad de captación de radicales libres a dosis no citotóxicas.

RECOMENDACIONES

Los compuestos bioactivos presentes en los extracto de *P. peltatum* tienen la capacidad de modular el sistema inmunitario. Es de interés conocer los principios activos que presenta cada uno de los extractos y poder establecer los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa y ejerce sus efectos inmunomoduladores.

Los próximos pasos deberían ser, aislar los compuestos bioactivos presentes en los extracto de *P. peltatum* y evaluarlos de forma independiente para poder individualizar sus funciones.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, R. (2000). Remington Farmacia 20 a Ed., Madrid España, Editorial Medicina Panamericana. P.p.1736.
- Alzamora, L., & Et al. (2007). Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*. *Revista Peruana de Biología* 13(3), 211-214.
- Aristil, P. (2010). Hill Internamericana Farmacología básica y clínica. 5ta ed. Mexico DF, Mc Graw. *Farmacología básica y clínica. 5ta ed. Mexico DF, Mc Graw*, pp.199-201.
- Bargallo, A. (2015). Alteraciones en el funcionamiento de los macrófagos . *Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Berdonces, J. L. (2003). Historia de la fitoterapia. *Dialnet, Historia de la fitoterapia*, 142.
- Bermúdez, J. c. (2017). Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro de hojas de *Piper peltatum* L. *Universidad de Chimborazo*, 95.
- Bone, R. (1996). Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*, 24: 163 - 172.
- Bordes, G., Martínez, B., & García, O. (2010). El proceso Inflamatorio, Departamento de enfermería y fisioterapia Universidad de Granada.
- botanicas, P. p. (25 de 09 de 2013). *Journal Ethnopharmacology*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/55844311/Album-Digital->.
- Bravo, L. J. (2007). Reflections on emergency medicine and intensive therapy. *Rev. Gastroenterol Mex.*, 91-101.
- Breitbach, U. e. (2013). Amazonian Brazilian medicinal plants described by C . F . P . von Martius in the 19th century. A.: *Journal of Ethnopharmacology*. [consulta: septiembre 2018], 10.1016/j.jep.2013.02.030. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500885>.
- Carmona, M. (2010). *La Inmunología en la Salud y el la Enfermedad*. Mexico: Editorial Medica Panamericana .

- Chavez, C., & col. (2018). Efecto antiinflamatorio de fracciones flavonoides de *lepechinia meyeri* (Walp.) Epling (Salvia) sobre leucocitos de pacientes con artritis reumatoide. *Rev. Perú Med.*
- Cleaves, C. (2002). Etnobotánica Médica Participativa en siete comunidades del Parque Nacional de Laguna. Guatemala : universidad de san Carlos de Guatemala.
- Damas, Franchimint, & AT, K. (2009). sepsis and serum cytokine concentrations and Cytokine profile in elderly patients with sepsis. *Care Med* , 74-8.
- Danelutte, A., Lago, J., & Young. (2003). Antifungal Flavanones and prenylates hidroquinonas from piper . 555-9.
- Danelutte, A., Lago, J., Young, M., & Kato. (2003). antifungal flavanones and prenylates hydroquinones from piper crssineervium Kunth. *Phytochemistry*, 64 (2) 555-9.
- Danelutte, A., Lago, J., Young, M., & Kato, M. (2003). Antifungal flavanones and prenylates hidroquinonas from Piper crsssinervium Kunth *Phytochemistry*. 64 (2), 555-9.
- Danelutte, A., Lago, J., Young, M., & Katto, M. (2003). *Anntifugal flavanoves and prenylates Hydroquinones from Piper crsssnervium Kunth Phytochemistry*, 64(2),555-9.
- Davies, M., & Hagen, P. (1997). Systemic inflammatory response syndrome. *Br J. Surg.* 84; 929-935.
- Davies, M., & toward. (1997). Systemic inflammatory response syndrome. *Br J surg*, 84: 920-935.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., & Marcia, M. (2008). Herbario QCA y Herbario AAU Quito. *Enciclopedia de las plantas Útiles del Ecuador.*
- De Oca, M. (2005). Geografía de Bolivia. 3.
- De Saint, B. e. (1998). The cytoquine profile expressed by human dendritic cells depend on cell subtype and of activation . *J immunol*, p 1666.76.
- Delgado, B. E., Garcia, M., Ybarra, m., Luna, M. C., & Martinez, D. (2012). Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardicha indica*, *Piper auritum* y *Peteveria alliaceae* para el control de *Spodoptera exigua*. *Revista Chapingo Serie Horticulture*, 18(1): 55-69.

- Delves, P., Roitt, I., & Burton, D. (2011). The immune system. Inmunidad innata. En *Inmunología fundamentos* (págs. 343:37-49). España: Editorial Medica, Panamericana.
- Desmarchelie, & Ralentización. (2000). extracto de metanol de hojas Pothomorphe peltata. *El servier*.
- Domingos, J. e. (2013). Volatile Constituents of Brazilian Piperaceae The Oils of Pothomorphe. www.tandfonline.com/doi/abs/10.../10412905.
- Dyer, L., Richards, J., & Dodson, C. (2004). Isolation, Synthesis and Evolutionary Ecology of Piper Amides. *MRM/KJ*, 117 - 139.
- Fan, H. (2002). Oxygen radicals trigger activation of NF-kappa B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282(5): P 778-86.
- Farnsworth 1985, N. R., Akerelo 1993, O., & WHO 2002, B. E. (s.f.). Medicinal plants in therapy. *bulletin of the world health Organization*.
- Feio, D., Desmarchelier, & Gurni. (1996). acción antiinflamatoria en el Alto Ucayali Ritual medicinal plants of the eséjas of the Amazonian rainforest. *Ethnopharmacol*, 138.
- Fernandez, L. (2008). Clínica., Farmacología Básica y Clínica 18 a ed. Madrid-España- Médica Panamericana.
- Fernandez, M., Saenz, M., & Garcia, M. (1998). Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from Scrophularia frutescens, *J Pharm Pharmacol*. *Pharmacol*, 50(10); p. 1183-6.
- Flores, E. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora Boliviana Tesis doctoral. Bolivia. Universidad de la Laguna. Facultad de ciencias y Tecnología.. 21p.
- Flores, E. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de la especie del género Piper de la flora boliviana. *Universidad Mayor de San Andres (Tesis Doctoral)*.
- Flores, E. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora Boliviana. *Tesis doctoral. Bolivia. Universidad de la Laguna. Facultad de ciencias y Tecnología.*, 21p.

- Flores, Q. E. (2006/7). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. La Paz-Bolivia.
- Flowering. (2008). AFPD African Flowering Plants Database - Base de Donnees des Plantes a Fleurs D'Afrique. *Base de Donnees des Plantes a Fleurs D'Afrique*.
- Gallucci, S., & Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 13:114-119.
- García, P. (2008). Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, pp 91-159 .
- Garcia, P. (2008). Inflamación *Rev. R. Academia de Ciencias. Exactas Fisicas y Naturales (Esp.) Mexico-D.F. No. 1 Vol. 102 P. p2-3*.
- Geneva. (2000). *Tradicional Medicine and Pharmaceutical Medicine Perspective on Natural Products for the Treatment of tropical Disease*. Scientific Working Group Geneva.
- Graves, D., & Jiang, Y. (1995). Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6:109-118.
- Grijalva, A. (2006). Familia Piperaceae. En: *Flora útil etnobotánica de Nicaragua. 1 ed. Managua: Marena Araucaria*, 21p.
- Gupta, M., Santana, A. I., & Alex, E. (2000). Plantas medicinales de Panamá. *Revista de Panamá*, 413.
- Gustafson, K. (1992). The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives. *J. Org. Chem.* Vol. 57, núm. 6, p. 2809-2811. Disponible en: pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00036a010.
- Gustafson, K., & et. (1992). The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives. *A: J Org Chem.* Vol. 57, núm. 6, p 2809-2811 [consulta 25 de abril 2019] disponible en [pubs. ascs. org/doi/ pdf](https://pubs.acs.org/doi/pdf).
- H, A., Arase, N., & Saito., T. (1996). IFN- γ production by Natural Killer (NK) cells and NK 1.1 + T cells upon NKR-P1 cross-linking *J. J. Exp Med* , 183:2391-96.
- Haj, M., & Neilly, I. (1995). Influence of white blood cells on the fibrinolytic response to sepsis: studies of septic patients with or without severe leucopenia. *Br. J. Haematol*, pp; 90:541-547.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1989). *Free radicals in biology and medicine. 2 nd ed. oxford: clarendon Press;*.

- Halliwell, B., Rafter, & Jenner. (2005). *American Journal of Clinical Nutrition Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?.*, 2685-765.
- Hamblin, A. (1993). Cytokines. En: Rickwood D., Male D. Cytokines and cytokine receptors. New York: Oxford University Press. p. 1-19.
- Harvery, & Newman. (2007). Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Rev. cubana de plantas medicinales*, 461 - 77.
- Heide.L. (2001). Traditionelle Arzneipflanzen in der Gesundheitsversorgung der dritten. *Zeitschrift fur Phytotherapie*, 12, 1-8.
- Hespporte, L., & Barbosa. (2015). anticancer and Anti. Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum*. *Research Article*, 1-9.
- Heywood. (1978). Flowering plants of the World. 1978. *Oxford University Press, Oxford*, 335.
- Hoffman, J., & Kafatos, F. J. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity *Science*. 284: 1313-1318.
- http://www.hear.org/pier/commonnames/details/piper_peltatum.htm. (02 de 12 de 2013). Obtenido de peltatum, Piper.
- <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema25/etexto25.htm> 2013 noviembre 21. (s.f.).
- Jaramillo, Q. (2006). *Botanica y Biogeog.* 1266- 1278.
- Jawerz, J., & Ganong, W. (1992). Microbiología medica, Fidiología Médica. *Manual Moderno, Mexico*.
- JL, V., Preiser, & Friedman. (1994). Endothelial cell funtion in the critically ill. 174-180.
- Juarez, M. d. (2013). Actividad inmunomoduladora in vitro de extractos y compuestos de plantas Mexicanas medicinales". *FES-Saragota*.
- Kalinski. (1999). T- cell priming by type-2 and pype-1 pilarized dendritic cells. *Today inmunol*, p 561.7.
- Kapoor, M., & Clarkson, B. (2005). The role of antioxidants in models of imflamation; emphasis on L- arginine and rats. *Journal of Ethnopharmacology* . 112:300-304.

- Lullman, h., Mohr, K., & Ziegler. (1992). Atlas de farmacología. . *Edición Científica y Técnicas S.A.* , Baeceloma , España Pag; 180 -183.
- Magrone, T., & Candore, G. (2008). Los polifenoles de vino tinto modulan la respuesta inmune: importancia biológica y clínica. *Bentham Science*.
- Mahendran, G., & Narmatha, B. (2013). antioxidant and-anti proliferative activity of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. *Int J. Pharm Sci ISSN 2320-1215*.
- Majetschak, & Surbatovic. (2010). Polymorphism to severe sepsis in trauma patients. 342.
- Martinez, A. (2007). Fisiopatología de la inmunología. *Universidad de Concepción, patología general*, 1-3.
- Martinez, C. A., & Selva Rivas, A. (2005). funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *FacMed UNAM* .
- Martinez, J. (2009). Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de Piper(*Piperjacquemontianum*, *piperdonnellsmithii* con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala). *Universidad de San Carlos. Facultad de Agronomía y Ciencias Químicas y Farmacia.*, 62 p.
- McLellan, A. (2002). Anatomic location and T cell stimulatory funtions of miuse dendritic cell subsets defined byCD4 and CD8 espresion blood. 2084-93.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the inmune response. *Nature*. 449: 819-826.
- Mejia, K., & Renfijo, E. (2000). *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Segunda.Lima: Agencia Española de cooperación internacional (AECI) y el Instituto de Investigaciones de la,* www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L017.pdf.
- Methnikoff, E. (1978). Comparativr psthology of inflammation. *New York: Dover*.
- Monserrat Sanz, J. G. (2017). *introducción al sistema inmune, componente celular del sistema inmune innato*. medicine-programa de Formación Médica Continuada Acreditado.

- Moreira, A., & Spitzer, V. (2000). Schenkel EP.. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *PhytotherRes*, 14 (8); p638-40.
- Moreno, J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW264.7. *Free Radic Biol Med. BioMed*, 35 (9);p 1073-81.
- Muñoz, A. (2014). "Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de Santa Maria (*Piper peltatum*) Mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*)". Ecuador, Riobamba, Ecuador.
- Muñoz, D. (2008). Estudio Fitoquímico y evaluación de la actividad fungica e insecticida de la especie de *Piper eridopon* (Piperaceae). *tesis inedita de maestria Universidad Nacional de Colombia: Bogot.*
- Muñoz, M. A. (2014). "Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de Santa Maria) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*)". *Escuela Superior Politecnico de Chimborazo.*
- Nagorsen, D., & Moser. (2004). Cytoquine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine*, p. 32-5.
- Nelson, N. J., Belosevic, M., & Green, S. (1992). Interleukin-2 and the regulation of macrophage cytotoxic activities *Adv. . Exp. Med Biol.*, 329: 77-88.
- Nudape. (2010). *Garantizar derechos sociales para "Vivir Bien"*. Bolivia: Boletín sobre el estado del Desarrollo Humano en Bolivia.
- Nuñez, R., & Castro, A. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. 1-6.
- Nuñez, V. a. (2005). The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives. myotoxic phospholipases A 2 from Bothrops snake venoms : Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. A]. Vol. 66, p. 1017-1025.
- O' Doherty, U. e. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Inmunology*, p. 487-93.
- Oliveira, Vásquez, D., & Bermudez. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *una revisión. Revista de Ciencias y Tecnología*, 453-459.

- Parmar, & Jain. (1997). Phytochemistry of the genus piper *Phytochemistry*. 591 - 673.
- Peñarrieta, M., & Tejada, L. (2014). compuestos fenolicos y su presencia en alimentos . *Revista Boliviana de Química* , 68-81.
- Perazzo, F., Sauza, G., Lopez, W., cardoso, L., Carvalho, J., & Nanayakara, N. (2005). Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *Ethnopharmacol*, 99: 215–220.
- Perez, A. (2010). fisiopatología de la Inflamación. *Instituto de Medicina* .
- Peris, J., & Gómez, S. (2011). *Fitoterapia Aplicada*. Valencia.
- Pino, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del Género Piper (PIPERACEAE). *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* , 27(1): 67-75.
- Pinto, A. e. (2006). Biomass production in cultivated *Pothomorphe peltata* Miq . (Piperaceae) as a function of harvest time in Manaus , Amazonas State , Brazil . *A. Rev. Bras. Pl. Med.* 2006, Vol. 8,, 98-101.
- Puertas, & Mejía, M. (2009). Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de plantas Medicinales*.
- Puertas, M. G., & Benjamin, R. (2009). Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14 (2).
- Quijano, M., & Callejas, M. (2006). . *Journal of Biogeography Area of endemies and distribution patters for Neotropical Piper species Pipereceae*, 1266 - 1278.
- Quijano, M., Callejas, M., & Miranda. (2006). *Journal of Biogeography Areas of endemies and distribution patters for Neotropical Piper especies (Pipereceae)*, 5(33) 1266-127B.
- Quijano, M., Callejas, M., & Miranda, D. (2006). Areas of endemiesand distribution patters for Neotropical Piper species (Pipereceae). *Journal of Biogeography*, 5(33), 1266-1278.
- Quiñones Dextre, R. (2018). Estudio de la actividad leishmanicida in vitro de ectractos y fracciones de especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

- Recio, M., & al, e. (1995). Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticolum* depending on single or repeated local TPA administration. *PlantaMed*, *PlantaMed*, 61(6); p. 502-4.
- Rios Cañavate, J. (1994-1995). Fitoterapia de la inflamación, in *Natura Medicatrix*. .
- Rivera, D. (2008). Caracterización de Aceites Esenciales por Cromatografía de Gases de Tres especies del Género piper y Evaluación de la Actividad Citotóxica., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Escuela de Química Farmacéutica., Universidad de San Carlos de Guatemala., San José - Guatemala.,: TESIS., ., Pp. 6 - 18.
- Robbins, & Dalenz. (2010). Patología estructural u funcional Inflamación aguda y crónica; curso de patología Inflamación y reparación. *Elsevier España*, 47-116 ; La Paz Bolivia 1996 20-46.
- Robinson, S. P. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *eur J. Immunol.* p. 2769-78.
- Rocha, F. (2015). :Una sustancia extraída de una planta amazónica se mostró eficaz para combatir la malaria.
- Rojas, A. B. (2013). Caracterización del uso tradicional medicinal de los recursos no maderables del bosque, en dos comunidades del P.N-A.N.M.I. Madidi en el Municipio de San Buena Aventura del Departamento De La Paz. *tesis*. La Paz, Bolivia.
- Romani. (19994). prolifrtating dendritic cell progrnitors in human blood. 83- 93.
- Saenz, J. (1993). universidad de Antioquia. *Revista Química Actualidad y Futuro*.
- Salinas, C. (2011). *La Inmunología en la salud y la Enfermedad*. Mexico: Editorial Médica Panamericana.
- Salinas, C. (2011). *La inmunología en la salud y la enfermedad*. Mexico: Editorial Medica Panamericana.
- Salinas, C. (2012). *La Inmunología en la Salud y la Enfermedad*. Mexico : Medica Panamericana .
- Salinas, M. (2011). *La Inmunología en la Salud y la Enfermedad*. Mexico- Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.

- Sallusti, F. (2002). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Hum immunol*, 29(5) p. 1617-25.
- Salvill, J., Wyllie, A., Henson, J., Walport, & Henson. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Clin. invest*, 865-875.
- Servais, S., & Koubi, H. (2003). Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 35(1): p. 24-32.
- Shorman, S., & Liu. (2002). Mouse and dendritic cell subtypes. *Nat rev immunol*, p. 152 .61.
- Silva, E., & Oliveira, P. (2013). *MDPI molecules -Estabilidad y actividad antioxidante de los derivados del 4 nerolidilcatecol*, 178-189.
- Silva, E., Lagos, K., & Rocha, L. (2013). Stability and Antioxidant Activity of Semi-synthetic Derivatives of 4-Nerolidylcatechol. *www.mdpi.com/journal/molecules*, Pp 179.
- Soto, M. (2015). *Estudio fitoquímicos y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedentes de la región Amazonas*.
- Steinman, R., & Cohn. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. p. 1142 -62.
- Steinman, R., & Kaplan, W. M. (1978). lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice; identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers and maintenance in vitro. *Prot Natl acad Sc USA*, p. 5132-6 ; 149:1-16.
- Stendley, P., & Steyemark. (1952). *Journal Ethnopharmacology. compounds from Kaempferiapasiflora*, 116 (1) 191-193.
- Tebbs, M. (1993). Revision of Piper(Piperaceae) in the New World 3. *Londres: Biodiversity Heritage Library. [Consulta: 03 marzo 2017]. ISBN 0153121000203. Disponible en: www.biodiversitylibrary.org/part/98680*.

- Townsend, W. R. (2003). El camino al manejo de sostenible de los Recursos Naturales . *las tierras bajas de Bolivia Memorial de simposio Internacional Prioridades de Investigación Científica sobre Recursos Naturales* .
- Valko, M., Leibfritz, D., & Moncola, J. (2007). Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*. 39; 44-84.
- Vega, G. B. (2008). Inflamación Rev.Fac. Med UNAM vol 51 No 5. *medigraphic*, pp 2-3.
- Voigt, R. (1982). Tratado de tecnología Farmacéutica. *España acriba*.
- Wang, & JC, G. (2008). Molecular and cellular aspects of sepsis - inducen inmunosupresion . *Med- Berl*, 495-596.
- WHO. (2004). Issue guidelines for herbal medicines, Bulletin of the World. *Health Organization*, 82:238.
- Widowati, W., & Wijaya, L. (2013). Efectos antioxidantes, anticancerígenos y que inducen apoptosis de los extractos de Piper en células HeLa. *Revista de Medicina Experimental e Integrativa*, vol. 3 Número 3, p225-230. 6p.
- Yamada, H. (1991). Natural products of commercial potential as medicines . *Current Opinion in Biotechnology*, 2:203-210.

ANEXOS



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: lpb@accelerate.com, lpb.dir@accelerate.com

PLANTAS COLECTADAS POR: ROSALIA LIMACHI VASQUEZ (La Paz)

Determinada por : Rossy de Michel (LPB)

Fecha : 14 de marzo de 2017

1 Piperaceae

Piper peltatum L.

