

# Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda

Marisol Rodríguez\*, Nadezdha Vergel\*, Luis Fernando Ospina\*<sup>1</sup>, Jairo Calle\* y Roberto Pinzón\*

## Resumen

El efecto antiinflamatorio de sustancias aisladas de plantas medicinales colombianas fue evaluado mediante dos modelos de inflamación aguda: edema auricular inducido por TPA en ratón y bolsa de aire / zimosán en rata, encontrándose resultados promisorios (ej. actividades evidentes *in vitro* a concentración 100  $\mu\text{M}$ ) para amarisolide, un clerodane aislado de *Salvia rubescens*, y los glicósidos de ésteres alifáticos aislados de cálices de *Physalis peruviana*. Adicionalmente, se evaluó mediante métodos colorimétricos el potencial efecto inhibitorio sobre la liberación y la actividad elastasa y mieloperoxidasa (MPO), dos enzimas de desgranulación neutrofílica implicadas en procesos inflamatorios. Los resultados apuntan a que parte del efecto antiinflamatorio de dichas sustancias se debe a actividad directa y/o indirecta sobre estas enzimas.

**Palabras clave:** Elastasa - mieloperoxidasa - amarisolide - arbutina - ayapín - *Critoniella acuminata* - *Physalis peruviana* - *Salvia rubescens*.

## Summary

### Evaluation of elastase and myeloperoxidase activities as markers of leukocyte degranulation in acute inflammation models

In this study, we investigated the effect of four herbal drug constituents—amarisolide (a neoclerodan of *Salvia rubescens*), arbutin (hydroquinone of *Salvia rubescens*), ayapin (a coumarin of *Critoniella acuminata*) and *Physalis peruviana* glycosides—on the polymorphonuclear leukocytes degranulation. For elastase and myeloperoxidase, two proinflammatory agents related to leukocyte migration and degranulation, the enzymatic levels were tested in mouse ear oedema and rat air pouch exudates. Amarisolide and *Physalis peruviana* glycoside exhibited antiinflammatory activity in mouse ear oedema and RAP/zymosan. It might be possible that these compounds showed a inhibitory effects (100  $\mu\text{M}$ , *in vitro*) on MPO and elastase due to some inhibitory mechanism for the leukocyte migration and degranulation.

**Key words:** Elastase - myeloperoxidase - amarisolide - arbutin - ayapin - *Critoniella acuminata* - *Physalis peruviana* - *Salvia rubescens*.

## Introducción

Las enfermedades que cursan con procesos inflamatorios crónicos, incluyendo la artritis

reumatoidea, EPOC y la fibrosis quística, son algunos de los principales problemas de salud que afectan a la población mundial y aunque se

Recibido para evaluación: febrero 7 de 2005

Aceptado para publicación: julio 18 de 2005

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá D.C., Colombia.

1 E-mail: lfospinag@unal.edu.co

conocen varios agentes para manejar este tipo de desórdenes, se evita su uso prolongado debido a los múltiples y severos efectos indeseables. Adicionalmente, el carácter multifactorial de este tipo de patologías hace necesaria la investigación de nuevos blancos terapéuticos que permitan realizar un tratamiento más selectivo y eficaz. De ahí el interés por el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios, muchos de los cuales se habrán de obtener de fuentes como las plantas medicinales. Estudios previos del grupo de investigación en Productos Naturales Bioactivos, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, basados en la información etnobotánica, permitieron la confirmación de actividad antiinflamatoria y el aislamiento de algunos compuestos asociados a las fracciones activas; los cuales fueron seleccionados para el presente estudio.

Los neutrófilos desempeñan papeles normales o de defensa en los procesos inflamatorios, o anormales como en las alergias y en las enfermedades autoinmunes. En estas últimas, el arsenal enzimático rico en colagenasas y proteasas va a producir destrucción de los tejidos. Se ha propuesto que la excesiva actividad elastasa extracelular y las especies oxigenadas, tales como el ácido hipocloroso - cuya producción está catalizada por la mieloperoxidasa, generadas durante la fagocitosis, están implicadas directamente en el daño tisular (1). Consecuentemente, se hace necesario el descubrimiento de sustancias que actúen como inhibidoras de la desgranulación y/o de la actividad enzimática leucocitaria, en particular, elastasa y mieloperoxidasa.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial efecto inhibitorio de principios bioactivos sobre dos enzimas neutrofílicas -elastasa y MPO- y así contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de sustancias con actividad antiinflamatoria. Se evaluaron los niveles enzimáticos en dos modelos *in vivo* y tres

modelos *in vitro*, con el fin de establecer si el efecto es producido por inhibición directa de la enzima, inhibición de la desgranulación, inhibición de la migración o por citotoxicidad sobre los leucocitos polimorfonucleares (PMNs).

## Metodología

### Citotoxicidad

El ensayo de reducción del MTT se realizó para establecer el potencial efecto citotóxico de los compuestos en estudio. Se incubaron en microplaca, durante 30 minutos a 37 °C, 200  $\mu$ L de una suspensión de PMNs ( $5 \times 10^6$  cél/mL) con 2  $\mu$ L de solución problema (Cf: 100  $\mu$ M) o 2  $\mu$ L de vehículo. Después de centrifugar a 1850xg por 10min a 4°C, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente para no arrastrar las células y se añadió a cada pozo 100  $\mu$ L de una solución de MTT de 0.42 mg/mL en HBSS. La placa se incubó a 37° C durante 90 min o un tiempo diferente según la intensidad del color que va apareciendo. Nuevamente, se centrifugó a 1850xg por 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar el sobrenadante, se añadieron 100  $\mu$ L de DMSO y se agitó para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 492 nm descontando un blanco de DMSO. El porcentaje de viabilidad fue calculado con respecto a los controles (cuya absorbancia promedio se toma como el 100% de viabilidad celular) (1-3).

### Edema auricular inducido por TPA

Se realizó siguiendo el método introducido por De Young y col. (4). Se emplearon ratones ICR entre 20 y 30 g, hembras o machos, se distribuyeron por peso en grupos de 6 animales. Se aplicaron 10  $\mu$ L de acetona, indometacina o la sustancia problema (500  $\mu$ g/oreja) según el

caso, por cada cara de la oreja derecha del animal. Inmediatamente después, se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  del agente irritante (TPA, 2.5  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ ) por cada lado de la oreja tratada. 4 horas después se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se extrajo la sección central de las orejas izquierda y derecha de cada animal con un sacabocados de 6 mm de diámetro. Se pesaron las secciones cortadas, se dividieron cuidadosamente en trozos pequeños y se homogenizaron con 750  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 80mM con Hexadeciltrimetilamonio bromuro 0.5% en un homogenizador de tejidos blandos con el fin de determinar posteriormente los niveles enzimáticos en las orejas tratadas. (5)

### Bolsa de aire en Rata / Zimosán

Ratas Wistar de 150 a 200 g se distribuyeron aleatoriamente de modo que en cada caja existiera un representante de cada tratamiento. El día 1 se inyectaron 20 mL de aire estéril en el dorso del animal para formar una cavidad subcutánea. El día 3 se reinyectaron 10 mL de aire estéril para reemplazar el aire absorbido. Al sexto día de la inyección inicial se administraron el agente irritante y los productos en estudio. El grupo control se inyectó con 1 mL de zimosán, a los grupos problema zimosán más el producto en estudio y, al grupo blanco sólo suero fisiológico. Transcurridas 4 h de la administración del irritante los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recuperó el exudado contenido en la bolsa de aire con 1 mL de suero fisiológico. Se realizó el recuento de PMNs con el fin de evaluar la migración leucocitaria y se centrifugó el exudado a 1850xg durante 10 min a 4°C. Por último, se recogió el sobrenadante y se conservó a -70°C hasta el momento de la determinación de los niveles enzimáticos (6,7).

### Actividades enzimáticas

**Desgranulación.** Se preincubaron durante 5 min a 37°C 500 $\mu\text{L}$  de una suspensión de PMNs humanos (2.5\*10<sup>6</sup> cél/mL) con 5 $\mu\text{L}$  de los productos en estudio (Cf: 100 $\mu\text{M}$ ) o la sustancia patrón. Tras la adición de 5 $\mu\text{L}$  de citocalasina B (Cf: 10 $\mu\text{M}$ ) se incubaron 5 minutos a 37°C. Posteriormente, para estimular la liberación de enzimas neutrofilicas se agregaron 5 $\mu\text{L}$  de N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Cf: 10nm) y se incubó por 10 minutos a 37°C. Después se centrifugó a 1850xg durante 10 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes.

La **actividad elastasa** se determinó en los sobrenadantes utilizando como sustrato N-ter-butoxi-carbonil-L-alanina (t-BOC, Cf: 200 $\mu\text{M}$ ) y cuantificando la cantidad de p-nitrofeniléster liberado (410 nm). (2,8). El posible efecto inhibitorio directo sobre una fuente de actividad elastasa también fue evaluado, así como en los exudados formados en el edema auricular y la bolsa de aire.

**Actividad MPO:** se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes de los tubos tratados con agente estimulante (control y problema), células sin estimular (blanco) y se colocaron en microplacas de fondo plano. Se añadió tampón PBS (pH: 7,4), tampón fosfato (pH: 5.4) y peróxido de hidrógeno (Cf: 0.3 mM) y se incubó por 5 minutos a 37°C. Se adicionó el sustrato TMB (Tetrametilbencidina, Cf: 1,5 mM) y se incubó por 3 minutos a 37°C. Para detener la reacción se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de acetato sódico 1,5 M (pH: 3.0) y, finalmente, se determinó la absorbancia a 620 nm. Igualmente, se evaluó el posible efecto inhibitorio directo sobre la MPO y sobre los exudados formados en el edema auricular y la bolsa de aire, utilizando como sustrato TMB y midiendo la absorbancia a 620 nm (1,7).

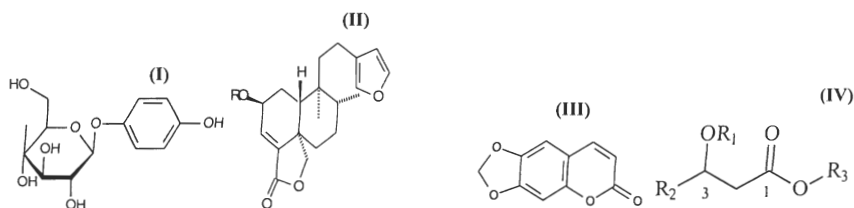
## Material vegetal

Las especies vegetales en estudio se escogieron por su uso en problemas relacionados con la inflamación. Se incluyeron: *Salvia rubescens* Kunth (Labiatae, “salvia”, COL 434050), de donde se aislaron amarisolide –un neoclerodano– (datos sin publicar) y arbutina –un glicósido de hidroquinona–; *Critoniella acuminata* (H.B.K.) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae, “patinegra”, COL 460202), de donde se aisló ayapín (9) –una cumarina– y *Physalis peruviana* L.

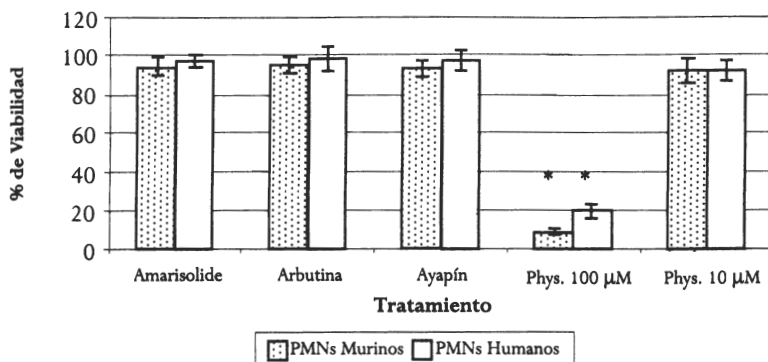
(Solanaceae, “uchuva”, COL 384814), de donde se obtuvieron glicósidos de ésteres alifáticos de cadena corta (10).

## Estadística

Los resultados están expresados como media aritmética de los valores  $\pm$  desviación estándar de la media. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza simple (ANOVA) seguido del análisis de comparaciones múltiples (Test de Dunnett) con un nivel de significancia  $p < 5\%$ .



**Figura 1.** Estructura química de (I) Arbutina (11), (II) Amarisolide (12), (III) Ayapín (9) y (IV) Núcleo base de glicósidos de *Physalis peruviana* (R<sub>1</sub>: Glu-Glu; R<sub>2</sub>: CH<sub>11</sub>; R<sub>3</sub>: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>/ R<sub>1</sub>: Glu-Ara; R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) (13)



**Figura 2.** Citotoxicidad de los compuestos en estudio frente a PMNs humanos y murinos. PMNs Humanos/Murinos  $5 \times 10^6$  cél/mL. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas cada tratamiento). Concentración de los tratamientos: 100µM. \* Test de Dunnett:  $p < 5\%$  frente al control. (Barra izquierda: PMNs murinos; Barra derecha: PMNs humanos).

## Resultados y Discusión

### Citotoxicidad

La viabilidad se establece con respecto a un control de DMSO al cual se le asigna el 100%, de esta forma se busca hallar la toxicidad correspondiente únicamente al compuesto en estudio y no al vehículo en que está disuelto. Se considera que un compuesto es citotóxico si en su presencia se obtienen porcentajes de viabilidad inferiores al 85% (1).

Se encontró que amarisolide, arbutina y ayapín no presentan una citotoxicidad significativa (dieron viabilidad mayor al 90 %) (figura 2) a la concentración ensayada (100  $\mu\text{M}$ ), mientras que los glicósidos de *Physalis peruviana* parecen poseer una citotoxicidad importante ya que la viabilidad celular fué inferior al 20 %, con respecto al blanco. Por ello se realizaron diluciones seriadas que permitieron establecer que, para esta mezcla de glicósidos, la concentración inocua frente a PMNs *in vitro* es 10  $\mu\text{M}$  y que el valor de CI50 para la reducción del MTT sería una concentración entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ . En la

literatura se reporta que el extracto etanólico de *Physalis peruviana* tiene actividad antihepatoma y efecto proapoptótico relacionado con disfunción mitocondrial (14), lo cual concuerda con los resultados encontrados y permite sugerir ampliar los estudios para evaluar actividad antitumoral sobre líneas celulares diferentes a PMNs.

### Edema auricular inducido por TPA en ratón

Es reconocida la utilidad de este modelo de inflamación aguda para el screening de actividad antiinflamatoria y, así mismo, para la evaluación de mediadores como Lts (leucotrienos), Pgs (prostaglandinas), enzimas lisosomales y migración-desgranulación leucocitaria evaluada a través de la liberación de las enzimas elastasa y mieloperoxidasa (1).

El porcentaje de inhibición del edema se calcula con respecto al grupo control, el cual recibe TPA y el vehículo de los tratamientos. Está dado por la expresión:

**Tabla 1.** Efecto de los compuestos en estudio sobre el edema auricular inducido por TPA en ratón.

Tratamiento (500 $\mu\text{mg}$ / oreja)	Delta de peso (mg) (M $\pm$ D.E.)	Inhibición (% $\pm$ D.E.)
Control (Vehículo)	23 $\pm$ 3	-
Indometacina	7 $\pm$ 3*	70 $\pm$ 12
Amarisolide	9 $\pm$ 3*	59 $\pm$ 13
Arbutina	21 $\pm$ 3	14 $\pm$ 10
Glicósidos de <i>Physalis peruviana</i>	11 $\pm$ 3*	51 $\pm$ 13

Ratones hembra ICR de 8 semanas de edad, n = 10

\* Test de Dunnett: p < 5% frente al control

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left( \frac{\Delta \text{ Tratamiento}}{\Delta p \text{ Control}} \right) 100$$

La indometacina usada como sustancia de referencia produjo una inhibición del edema superior al 70%, como era de esperarse por ser un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (15). Tanto el amarisolide, aislado de *S. rubescens*, como los glicósidos de *P. peruviana* presentaron una inhibición del edema auricular mayor al 50%, sin que haya diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de indometacina.

La arbutina en dosis de 500  $\mu\text{g}$ /oreja no produjo resultados positivos como antiinflamatorio en el modelo de screening utilizado. Sin embargo, su demostrada actividad antioxidante (16) podría potenciar el efecto antiinflamatorio encontrado para *Salvia rubescens* en estudios anteriores (17,18).

El ayapín no fue evaluado en el modelo de edema auricular debido a su baja solubilidad en los solventes aptos para el ensayo pero, en un estudio adicional para evaluar actividad antiinflamatoria en edema plantar por carragenina, ayapín inyectado vía intraperitoneal en una dosis 50 mg/kg

presentó una inhibición moderada ( $38 \pm 9\%$ ) del edema 3 horas después de la administración subplantar de carragenina.

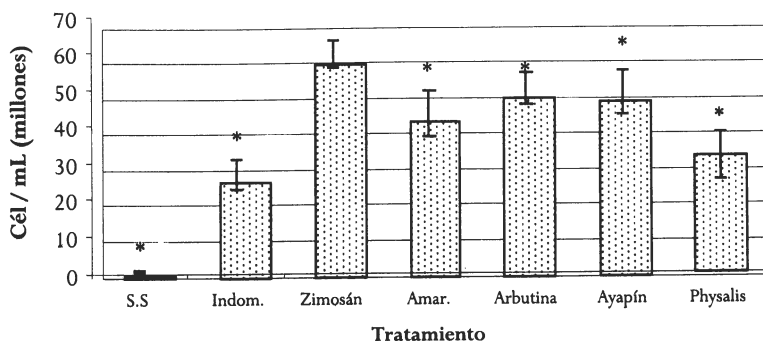
### Bolsa de Aire

La “bolsa de aire/zimosán” se constituye en un reactor para la obtención de exudados ricos en mediadores proinflamatorios, así como para la evaluación de posibles mecanismos antiinflamatorios relacionados con la migración-desgranulación leucocitaria, o la liberación de prostaglandinas y leucotrienos (1).

Un incremento importante en la migración leucocitaria fue observado en animales tratados con zimosán ( $57 \pm 3$  millones de cél/mL) en comparación con los animales tratados con solución salina ( $0.6 \pm 0.1$  millones de cél/mL).

El grupo tratado con indometacina disminuyó la acumulación de células en el exudado en un  $56 \pm 7\%$  (figura 3), resultado que coincide con los encontrados por otros investigadores (7).

Con los glicósidos de *Physalis peruviana* se observó una marcada inhibición de la migración leucocitaria ( $47 \pm 5\%$ ). Este menor recuento celular coincide en parte con los resultados de



**Figura 3.** Efecto de los compuestos en estudio sobre la migración leucocitaria en bolsa de aire. Ratas Wistar hembras de 160 g. Recuento en cámara de Neubauer. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento). Tratamientos = 1 mmol/bolsa. \* Test de Dunnett:  $p < 5\%$  frente al control.

inhibición de la desgranulación leucocitaria en edema auricular: un bajo nivel de actividades enzimáticas elastasa y MPO son reflejo, en ausencia de citotoxicidad, de una pobre migración celular.

El amarisolide produjo una disminución (inhibición del  $28 \pm 7\%$ ) del reclutamiento neutrofilico en la bolsa de aire, mecanismo que seguramente contribuye al efecto antiinflamatorio observado, y el cual se ve reflejado en los niveles enzimáticos de elastasa y MPO.

### Actividad enzimática en los exudados de bolsa de aire y edema auricular

Los niveles enzimáticos observados en los exudados de la bolsa de aire (figura 4) están directamente relacionados con el efecto sobre la migración leucocitaria y con el efecto antiinflamatorio observado en el ensayo de edema auricular.

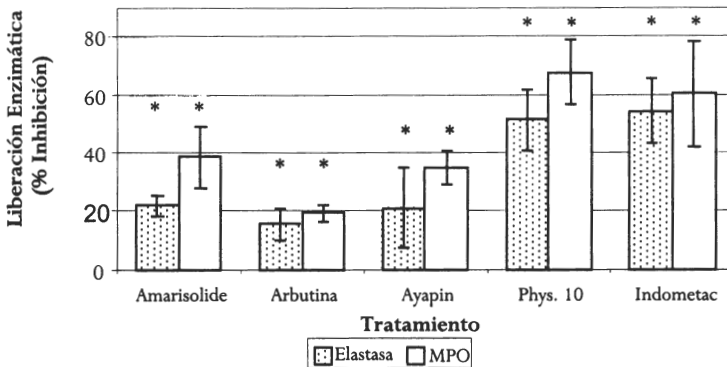
El fármaco de referencia, indometacina, produjo una inhibición de la actividad enzimática de  $54 \pm 11\%$  sobre la actividad elastasa y de  $60 \pm 18\%$  sobre la MPO. Estos resultados reafirman su uso como patrón de inhibición de migración leucocitaria.

Para el grupo tratado con los glicósidos de *P. peruviana* se observó una inhibición de  $51 \pm 11\%$  para actividad elastasa, y de  $68 \pm 11\%$  para MPO, lo que hace suponer que parte del efecto antiinflamatorio observado para estas sustancias está relacionado con un mecanismo de inhibición de la migración y desgranulación leucocitaria.

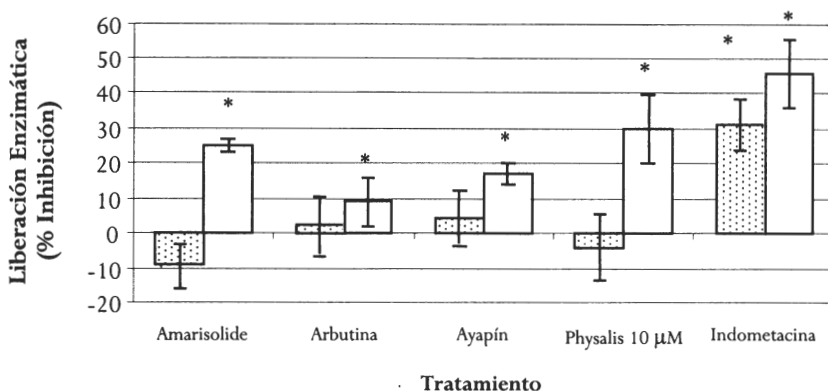
Los grupos tratados con amarisolide y ayapín presentaron un nivel de inhibición enzimática ( $22 \pm 4\%$  y  $16 \pm 5\%$  para elastasa, y  $38 \pm 10\%$  y  $35 \pm 6\%$  para MPO; respectivamente) que aunque es moderado puede contribuir en parte con el efecto antiinflamatorio observado en otros modelos de inflamación aguda.

Se observó una inhibición en la liberación de MPO mayor al 45 % en los exudados correspondientes a las orejas tratadas con amarisolide e indometacina, el grupo tratado con los glicósidos de *P. peruviana* presentó una inhibición del 18 % y en el caso de arbutina la respuesta fue nula.

Los resultados anteriores sugieren que la indometacina, el amarisolide y los glicósidos de *P. peruviana* inhiben la actividad elastasa y MPO. Este comportamiento podría deberse a inhibición del proceso de desgranulación.



**Figura 4.** Actividad enzimática MPO en los exudados obtenidos de edema auricular y bolsa de aire.  $\lambda$  elastasa: 415nm,  $\lambda$  MPO: 630nm. Cada barra es la media D.E. de 6 animales por sustancia (in vitro, 3 réplicas por muestra de cada animal). Tratamientos =  $1 \mu\text{mol/bolsa}$ . \* Test de Dunnett:  $p < 5\%$  frente al control. (Barra izquierda: Elastasa; Barra derecha: MPO)



**Figura 5.** Efecto de los compuestos en estudio sobre la desgranulación leucocitaria *in vitro*.

PMNs humanos  $2.5 \times 10^6$  células/mL,  $\lambda$  elastasa: 415nm,  $\lambda$  MPO: 630nm. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento). Tratamientos = 100 µM. \* Test de Dunnett:  $p < 5\%$  frente al control. (Barra izquierda: Elastasa; Barra derecha: MPO).

En el desarrollo del experimento se observó que amarisolide e indometacina presentan el mismo patrón de comportamiento tanto en la inhibición del edema como en la inhibición de los niveles enzimáticos, en ambos casos la inhibición de actividad MPO fue notablemente mayor que sobre elastasa. Inicialmente, este resultado haría pensar en un mecanismo compartido por los dos compuestos: además de un posible mecanismo antiinflamatorio tipo AINE se tendría una interferencia sobre los mecanismos de desgranulación leucocitaria con alguna pequeña contribución de la inhibición enzimática directa.

### Inhibición de la desgranulación leucocitaria *in vitro*

Para evaluar el efecto sobre la desgranulación leucocitaria se utilizaron neutrófilos de sangre periférica humana preincubados con las sustancias en estudio y posteriormente estimulados con citocalasina B (Cf: 10 µM) y fMLP (Cf: 10nM). De igual manera, se determinaron los porcentajes de inhibición de elastasa y MPO como indicadores

del proceso de liberación enzimático. La indometacina fue usada como fármaco de referencia. Las células preincubadas con esta sustancia presentaron el mayor porcentaje de inhibición (para elastasa  $31 \pm 8$  y para MPO  $46 \pm 10$ ) calculado con respecto al control (células preincubadas con vehículo). Estos resultados indican que este fármaco tiene actividad como inhibidor de la desgranulación y por lo tanto puede ser usado como control positivo en ensayos posteriores. También, se confirma *in vitro* la respuesta *in vivo* para la desgranulación en los exudados de tejido auricular.

Se evaluaron amarisolide, arbutina y ayapín en una concentración de 100 µM, y los glicósidos de *Physalis peruviana* a 10 µM. Se utilizaron estas concentraciones para garantizar que una disminución en los niveles enzimáticos elastasa y MPO son consecuencia de inhibición de la desgranulación y no por toxicidad sobre la célula. Las sustancias evaluadas presentaron un comportamiento irregular (figura 5) presentando muchas veces valores negativos que si bien no son significativos para suponer que existe un efecto pro-desgranulatorio



tampoco parecen suponer un efecto inhibitorio sobre la liberación enzimática.

### Inhibición enzimática directa

Este ensayo se realizó para determinar si los compuestos en estudio se comportan como inhibidores enzimáticos *in vitro*. La fuente enzimática proviene de PMNs humanos preincubados con citocalasina B y el agente quimiotáctico fMLP que convierte al neutrófilo de célula fagocítica a célula secretoria. La actividad enzimática residual fue determinada por métodos fotométricos, usando t-BOC para determinar elastasa y TMB para MPO.

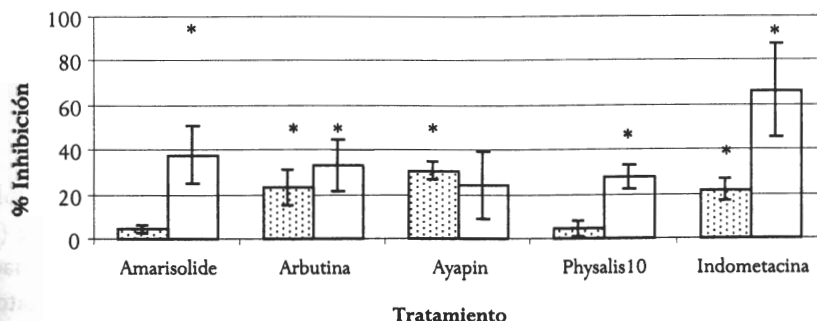
Los productos fueron evaluados en una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , excepto los glicósidos de *P. peruviana* que fueron ensayados a 10  $\mu\text{M}$ , con el fin de correlacionar los resultados de este ensayo con los encontrados en el de desgranulación leucocitaria *in vitro*. En ambos casos el fármaco de referencia fue indometacina (100  $\mu\text{M}$ ). El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a un control que contiene la fuente enzimática y el vehículo de los productos evaluados.

Frente a la actividad elastasa, el fármaco de referencia presentó una inhibición de  $22 \pm 5\%$ , que aunque es significativamente diferente de cero, no tiene relevancia biológica. La literatura reporta inhibidores de la elastasa como la  $\alpha 1$ -antitripsina (11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), digitoxina (1  $\mu\text{M}$ ), digitonina (0.01  $\mu\text{M}$ ) (19) y rapanona (10  $\mu\text{M}$ ) (1). Sería conveniente ensayar el comportamiento de estas sustancias frente a la elastasa neutrofílica humana en las condiciones del laboratorio.

Como se observa en la figura 6, ayapín y arbutina ejercen un discreto efecto sobre la actividad elastasa, con porcentajes de inhibición de  $31 \pm 4$  y  $24 \pm 8$ , respectivamente.

El amarisolide y los glicósidos de *P. peruviana* no mostraron inhibición sobre esta enzima en las condiciones evaluadas.

La actividad MPO fue evaluada indirectamente utilizando TMB como sustrato del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que no logra ser transformado en HOCl por la MPO residual. La indometacina inhibió la actividad MPO en un % de  $66 \pm 21$  en concordancia con los reportes bibliográficos (20). Amarisolide, arbutina y los glicósidos de *P.*



**Figura 6.** Inhibición enzimática directa por parte de los compuestos en estudio.

$\lambda$  elastasa: 415nm,  $\lambda$  MPO: 630nm. Cada barra es la media  $\pm$  D.E. de 4 experimentos (3 réplicas por tratamiento). Tratamientos = 100  $\mu\text{M}$ . \* Test de Dunnett:  $p < 5\%$  frente al control. (Barra izquierda: Elastasa; Barra derecha: MPO)

*peruviana* presentaron una actividad inhibitoria moderada con porcentajes de inhibición de  $38 \pm 13$ ;  $33 \pm 11$ ; y  $28 \pm 5$  como se muestra en la figura 6. Estos resultados sugieren que parte del efecto antiinflamatorio de amarisolide y los glicósidos de *P. peruviana* se debe a inhibición directa de la actividad enzimática MPO. La arbutina presentó una actividad inhibitoria de MPO *in vitro*, pero no *in vivo*, debido probablemente a que en el primer caso la enzima está más expuesta a la acción del xenobiótico y a que muchos mecanismos reguladores presentes en el animal íntegro están ausentes en un experimento *in vitro*.

En conclusión, los compuestos más promisorios por su actividad antiinflamatoria son amarisolide de *Salvia rubescens* y los glicósidos de *Physalis peruviana*. Este efecto posiblemente está relacionado con inhibición de la migración / desgranulación leucocitaria demostrada *in vivo*, e inhibición directa de la MPO demostrada *in vitro*.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó dentro del Proyecto PIBARTRI del CYTED en el grupo de investigación en Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, contando con financiación de COLCIENCIAS y el Convenio SECAB-CYTED.

## Bibliografía

1. L.F. Ospina, "Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona", Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 2000.
2. CYTED, "Manual de Técnicas de Investigación", 1995. pp. 81-127.
3. J. Smith, Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword, *J. Leukocyte Biol.*, **56**, 672 (1994).
4. L.M. De Young, J.B. Kheifets, S.J. Ballaron y J.M. Young, Oedema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents, *Agents Actions*, **26**, 335 (1989).
5. J. Martínez, A. Silván, M. Abad, P. Bermejo y A. Villar, Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA -induced ear oedema inhibitors, *J. Nat. Prod.*, **60**, 142 (1997).
6. J.C.W. Edwards, A.B. Sedwick y D.A. Willoughby, The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system, *J. Pathol.*, **134**, 147 (1981).
7. M. Payá, C. Terencio, M. Ferrándiz y M. Alcaraz, Involvement of secretory phospholipase A<sub>2</sub> activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation, *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1773 (1996).
8. I. Rioja, A. Úbeda, M. Terencio, I. Guillén, R. Riguera, J. Quintela, C. Peinador, L. González y M. Alcaraz, An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-II, *Eur. J. Pharmacol.*, **397**, 207 (2000).
9. F. González y M. Vesga, "Caracterización química de algunos metabolitos secundarios de *Critoniella acuminata* (H.B.K.) R.M. King & H. Robinson y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria" Tesis de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2003.
10. M. García y A. Lozano, "Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de los cálices de *Physalis peruviana* L", Tesis de

- Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2002.
11. Y. Shih y J. Zen, An electrochemical sensor based on clay coated scree-printed electrode for the determination of arbutin, *Anal. Chim. Acta*, **412**, 63 (2000).
  12. E. Maldonado, J. Cárdenas, H. Bojórquez, E. Escamilla y A. Ortega, Amarisolide, a neoclerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*, *Phytochemistry*, **42**, 1105 (1996).
  13. H. Mayorga, C. Duque, H. Knapp y P. Winterhalter, Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*), *Phytochemistry*, **59**, 439 (2001).
  14. W. Shu, N. Lean, C. Ching, L. Doung, W. Shyh y L. Chun, Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *Physalis peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells, *Life Sciences*, **74**, 2061 (2004).
  15. B.G. Katzung, "Basic & clinical pharmacology", 6 ed., Appleton & Lange, USA, 1995.
  16. C. Peña, L.F. Ospina, J. Calle y R. Pinzón, Evaluación de la actividad scavenger frente a los radicales superóxido, peróxido e hidroxilo por parte de algunos compuestos obtenidos de plantas medicinales colombianas, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **27**, 41 (1998).
  17. M. González, "Estudio de la actividad antiinflamatoria de sustancias de origen natural de plantas colombianas", Tesis de Maestría en Farmacología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2002.
  18. A. Araque, "Estudio de la actividad antiinflamatoria de principios bioactivos en modelos de dermatitis", Tesis de Maestría en Farmacología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2004.
  19. S. Johansson, U. Goransson, T. Luijendijk, A. Backlund, P. Claeson y L. Bohlin, A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products, *J. Nat. Prod.*, **65**, 34 (2002).
  20. G. Békési, R. Kakucsá, J. Sandorb, E. Sárváryc, I. Kocsisa, D. Sprintza, S. Várbírod, Z. Magyare, A. Hrabákf, J. Fehéray B. Székácsa, Plasma concentration of myeloperoxidase enzyme in pre and post climacterial people: related superoxide anion generation, *Experimental Gerontology*, **37**, 137 (2001).