

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Estudio de la vía de activación de macrófagos murinos de la
cepa BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana*
(color naranja)**

T E S I S

Que para obtener el Grado de Maestra en Medicina Molecular

PRESENTA

Lluvia Iris Arteaga Figueroa

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Vera L. Petricevich

CUERNAVACA, MORELOS 2018



FACULTAD DE MEDICINA

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n, Col. Volcanes. C.P. 62350, Cuernavaca Morelos, México
Tel.: (777) 329 70 48



Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2017.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la vía de activación de macrófagos de ratones BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (color naranja)**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lluvia Iris Arteaga Figueroa. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez



Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2017.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la vía de activación de macrófagos de ratones BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (color naranja)**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lluvia Iris Arteaga Figueroa. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Juan José Acevedo Fernández

Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2017.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director
Facultad de Medicina
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la vía de activación de macrófagos de ratones BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (color naranja)**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lluvia Iris Arteaga Figueroa. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e


Dra. Vera Lucia Petricevich



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n, Col. Volcanes. C.P. 62350, Cuernavaca Morelos, México
Tel.: (777) 329 70 48

1967 **50** años 2017
Autonomía
UAEM

Cuernavaca, Mor., 23 de mayo de 2017.

Dr. David Martínez Duncker Ramírez

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Estudio de la vía de activación de macrófagos de ratones BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (color naranja)**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Lluvia Iris Arteaga Figueroa. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

AGRADECIMIENTOS

A Dios por enseñarme lo mejor de la vida y por poner en mi camino a las personas correctas.

A la Dra. Vera Petricevich por su gran apoyo y confianza, por ser y estar siempre cuando la necesito, por ser una persona excepcional en toda la extensión de la palabra. GRACIAS.

A mis compañeros del laboratorio al Dr. Rodolfo Abarca y la Maestra Claudia García por el apoyo mostrado.

A CONACyT por la beca otorgada durante la Maestría.

DEDICATORIA

A mi hijo y esposo que amo con todo mi corazón.

A mis padres y hermana por su tiempo y apoyo.

Índice

Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iv
Abreviaturas	v
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Plantas Medicinales.	3
1.2 Metabolitos secundarios de plantas medicinales que se les atribuye propiedades curativas.	6
1.3 Generalidades de <i>Bougainvillea</i>	10
1.4 Generalidades sobre el Proceso Inflamatorio.	13
1.5 Macrófagos e Inmunidad	18
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6. RESULTADOS	37
7. DISCUSIÓN	59
8. CONCLUSIONES	67
9. REFERENCIAS	69

Índice de Figuras

Figura 1: Biosíntesis de los metabolitos secundarios.	9
Figura 2: Diferentes colores de <i>Bougainvillea</i> .	12
Figura 3: Diferentes metabolitos secundarios presentes en <i>B. xbuttiana</i> .	12
Figura 4: Equilibrio entre la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria.	16
Figura 5: Mecanismos externos a los que se expone un agente patógeno.	18
Figura 6: Diferenciación de la célula madre a macrófago.	21
Figura 7: Activación de macrófagos .	22
Figura 8: Nomenclatura y distribución tisular de macrófagos.	24
Figura 9: Cromatograma del extracto de <i>Bougainvillea xbuttiana</i> .	37
Figura 10: Porcentaje de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales expuesto al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas .	40
Figura 11: Cinética de formación de vacuolas tratados con el extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas .	42
Figura 12: Peróxido de hidrógeno en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	43
Figura 13: Porcentaje de expansión celular presentada por macrófagos expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas .	44
Figura 14: Velocidad fagocítica presentada por macrófagos expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	45
Figura 15: Porcentaje de fagocitosis presentada por macrófagos expuestos Al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	46
Figura 16: Velocidad fagocítica presentada por macrófagos expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	47

Figura 17: Producción de TNF- α en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	49
Figura 18: Producción de IFN- γ en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	50
Figura 19: Producción de IL-1 β en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	51
Figura 20: Producción de IL-4 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	52
Figura 21: Producción de IL-5 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	53
Figura 22: Producción de IL-6 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	54
Figura 23: Producción de IL-10 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	55
Figura 24: Producción de TGF- β en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	56
Figura 25: Producción de NO en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de <i>BxbE</i> , LPS e Interleucinas.	57

Índice de Tablas

Tabla 1: Tipos de extractos.	3
Tabla 2: Metabolitos secundarios y sus propiedades farmacológicas.	9
Tabla 3: Clasificación científica de <i>Bougainvillea xbuttiana</i> .	10
Tabla 4: Actividad Farmacológica de <i>Bougainvillea xbuttiana</i> .	11
Tabla 5: Estimulación de macrófagos y terminología adoptada.	30
Tabla 6: Anticuerpos monoclonales de captura y de detección marcados con biotina utilizados para la titulación de las diferentes interleucinas.	34
Tabla 7: Descripción de los compuestos encontrados en el extracto de <i>Bougainvillea xbuttiana</i> .	38
Tabla 8: Análisis cualitativa de los mediadores segregados por macrófagos estimulados.	58

Abreviaturas

Ácido hidroxietil piperazinil etano sulfónico	HEPES
Albumina sérica	BSA
Célula Presentadora de Antígeno	APC
Ciclooxigenasa	COX
Dióxido de Carbono	CO ₂
Especies Reactivas de Oxígeno	ROS
Extracto de <i>B. xbutiana</i>	<i>BxbE</i>
Factor de Necrosis Tumoral alpha	TNF- α
Factor Transformador de Crecimiento beta	TGF- β
Fosfato de Potasio	K ₂ PO ₄
Hidróxido de Sodio	NaOH
Interferón-gama	INF- γ
Interleucina-1	IL-1
Interleucina-4	IL-4
Interleucina-6	IL-6
Interleucina-8	IL-8
Interleucina-10	IL-10
Lipopolisacárido	LPS
Multiplicidad de Infección	MOI
N`naftiletlenodiamina	NAP
Nitritos	NO ₂
Nitratos	NO ₃
Óxido Nítrico	NO
Óxido Nítrico Sintetasa	NOS
Óxido Nítrico Sintetasa Constitutiva	cINOS

Óxido Nítrico Sintetasa Inducible	iNOS
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂
Radical superóxido	O ₂
Transaminasa Glutámico Pirúvico	TGP
Unidades Formadoras de Colonia por mililitro	UFC/mL
Unidades Formadora de Colonia-Granulocito/Macrófago	GEMM-CFU
Unidades Formadora de Colonia de Macrófago	M-CFU
Receptores Tipo Toll-4	TLR4
2,2-Difenil-1-picrilhidrailo	DPPH
3- Etilbenzotiazona-6-acido-sulfónico	AB

RESUMEN

El uso de plantas empleadas tradicionalmente, se ha consolidado como una alternativa para el tratamiento de enfermedades de vías respiratorias principalmente, en países en desarrollo como México. Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de estrategias de investigación que ayuden en los problemas de salud, haciendo énfasis en extractos de origen vegetal. El presente trabajo de investigación se enfocó en la aplicación de bioensayos para la observación de la actividad inmunoreguladora del extracto de *B. xbutiana*. Ensayos realizados en ratones de la cepa BALB/c expuestos a el extracto de *B. xbutiana* ha demostrado propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias, debido a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y contenidos fenólicos. Estudios preliminares de este extracto han demostrado su actividad inmunomoduladora. Como seguimiento de esta actividad el objetivo general del presente trabajo fue determinar la vía de activación de macrófagos peritoneales de ratones de la cepa BALB/c expuestos al extracto de *B. xbutiana* (variedad naranja).

Para evaluar el estatus funcional de los macrófagos se diseñaron varios ensayos: porcentajes de citotoxicidad, vacuolización y la producción de peróxido de hidrógeno, así como mediadores inflamatorios. El porcentaje de citotoxicidad del extracto sobre los macrófagos peritoneales, se determinó por medio de la técnica de coloración con cristal violeta. El estado funcional de los macrófagos fue determinado por medio de la formación de vacuolas, la producción de peróxido de hidrógeno y el porcentaje de expansión celular y fagocitosis. Los niveles de citocinas secretadas por los macrófagos expuestos al extracto fueron determinados a través del ensayo biológico para la titulación de y por ELISA. Los niveles de NO fueron evaluados mediante reacciones colorimétricas del reactivo de Griess.

Los resultados demostraron que el extracto de *B. xbutiana* produjo: bajos porcentajes de citotoxicidad, además, fue capaz de activar macrófagos ya que incrementó la formación de vacuolas, los niveles de peróxido de hidrógeno y el porcentaje de expansión celular y la fagocitosis, al igual que los macrófagos expuestos a LPS y/o a las interleucinas 10 y 4. Además, los macrófagos expuestos al extracto presentaron bajos o nulos niveles de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IFN- γ e IL-6, IL1- β , elevados niveles de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β y elevados niveles de NO.

En conclusión, el extracto de *B. xbutiana* fue capaz de activar a los macrófagos, ya que promueve la formación de vacuolas, induce la liberación de H₂O₂ e incrementa los porcentajes de expansión celular y fagocitosis. Los resultados obtenidos por el perfil de citocinas y NO que liberan estos macrófagos expuestos al extracto, sugieren que estas células fagocíticas son activadas por la vía alternativa M2c, ya que liberan elevados niveles de citocinas antiinflamatorias como: IL-10 y TGF- β , y bajos o nulos niveles de citocinas proinflamatorias como: IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , así, como el incremento en la secreción de NO.

1.- INTRODUCCIÓN

El proceso histórico de la utilización de las plantas, como fuente terapéutica, tuvo su inicio durante la propia evolución humana, cuyas prácticas volcadas al cuidado de la salud ha estado basado en los conocimientos populares que han sido transmitidos de generación a generación¹.

La Organización Mundial de la Salud, promueve el gran valor de las plantas medicinales en la atención primaria de millones de personas, estima que el 80 % de la población mundial utiliza estos recursos como principal fuente de atención de sus problemas de salud, acudiendo al médico tradicional de su comunidad que posee un conocimiento tradicional empírico. Sin embargo, dichos conocimientos se están perdiendo a un ritmo acelerado; este recurso se ve amenazado ante el avance tanto de la frontera agrícola como de las grandes ciudades y por falta de una recopilación sistemática escrita de los conocimientos, que normalmente son heredados de una generación a otra en las comunidades².

La etnobotánica es una actividad importante en el área de la investigación y desarrollo de medicamentos nuevos puesto que algunos reportes afirman que aproximadamente el 40 % de los productos farmacéuticos que se consumen en los países desarrollados proceden de fuentes naturales, principalmente de las plantas³.

Hasta el presente, todo lo publicado sobre la Etnobotánica ha sido encuadrado dentro de doctrinas ortodoxas. Los progresos adquiridos en los últimos tiempos han modificado radicalmente los conceptos químicos, biológicos y terapéuticos de la medicina. En esta hora de evolución, grandes conquistas y nuevos sistemas, la realidad dinámica que nos toca vivir exige darle un nuevo enfoque al arte de curar⁴.

En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene de la época prehispánica y, actualmente, diversos grupos étnicos lo conservan. Desde hace más de 30 años ha surgido el interés por integrar a la medicina tradicional dentro de los sistemas oficiales de salud para mejorar la calidad de vida de los pacientes, esto, por razones de orden cultural y económico³.

Cabe mencionar que la actividad farmacológica de las plantas medicinales se ha evaluado utilizando, principalmente, concentrados de éstas (denominados extractos), obtenidos por maceración en agua, alcohol, o mezcla de estos disolventes. Para el desarrollo de fitomedicamentos los extractos deben estar estandarizados y debidamente registrados ante la autoridad sanitaria, para lo cual, requieren de estudios fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos y biotecnológicos además de pruebas preclínicas y clínicas. Los estudios fitoquímicos deben incluir, el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos bioactivos y su concentración. Mientras que, los estudios farmacológicos y toxicológicos consistirán en la evaluación de las propiedades medicinales atribuidas a las plantas, en diferentes modelos biológicos, así como advertencias sobre sus interacciones farmacológicas y posibles efectos secundarios⁵. Los extractos son preparados farmacéuticos que por condiciones de higiene y preparación en su fabricación y envasado deben realizarse en laboratorios en condiciones estandarizadas. Los extractos pueden clasificarse en tres tipos como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Tipos de extractos

Tipos de Extractos	Características
Extractos fluidos:	Son aquellos en los que el volumen del solvente del extracto es igual al volumen de la planta seca que se haya usado.
Extractos blandos:	Son aquellos a los que se les retira el solvente parcialmente hasta tener una consistencia de ungüento.
Extractos secos:	Son aquellos a los que se les ha retirado totalmente el solvente y su apariencia es totalmente a la de un polvo fino.

(Tabla modificada de Olaya y Méndez, 2005⁶)

1.1 Plantas Medicinales

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en el suburbano, donde los servicios de atención médica son escasos, acentuándose en poblaciones principalmente marginadas⁷.

México posee una rica tradición en el empleo de las plantas medicinales entre sus varias prácticas curativas populares y se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre

3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Un total de 3,000 especies han sido compiladas en el atlas de plantas medicinales empleadas por diversos grupos étnicos. Increíblemente, aproximadamente el 1 % de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una minuciosa investigación tanto clínica como etnobotánica, para elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas³.

El estado de Morelos, ubicado en la zona centro de la República Mexicana, se ha caracterizado por su gran riqueza y diversidad vegetal con abundante flora medicinal tanto nativa como introducida, debido principalmente a su clima. Este estado registra el 16 % de la Biodiversidad de México⁵. Por otra parte, hay infinidad de plantas que tiene actividad farmacológica específica para ciertas enfermedades como:

Plantas con actividad antidiabética: Más de 400 plantas y extractos de plantas han sido descritos como beneficiosos para el tratamiento de la diabetes. Los efectos hipoglucemiantes encontrados en un buen número de plantas, aún no han sido investigados con profundidad, quedando todavía por ser comprobada su pertinencia⁸. Tradicionalmente son plantas utilizadas como antidiabéticas y que han mostrado actividad hipoglucemiante en animales de laboratorio y en humanos, pero a las que no se les ha identificado todavía el o los agentes responsables de dicha actividad. Algunas de estas plantas son la canela (*Cinnamomum verum*), el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), la bugambilia (*Bougainvillea*) entre otras⁹.

Plantas con actividad antioxidante: Un área muy importante en el campo de productos naturales es la determinación de la actividad biológica de las plantas y sus extractos. Muchas plantas son una fuente valiosa de agentes antisépticos y antioxidantes. Los antioxidantes de origen natural se usan cada vez con mayor frecuencia no solamente en los alimentos, sino también en diferentes preparados farmacéuticos y cosméticos¹⁰. Varios ensayos han sido utilizados para medir la actividad antioxidante de sustancias de origen natural. Éstos pueden ser divididos en dos grupos: (1) aquellos que miden la capacidad de sustancia(s) para atrapar radicales. (2) aquellos que miden la capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica. Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así

como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia del propio metabolismo, surgen algunas moléculas oxidantes que pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ROS), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o al envejecimiento humano. Entre los problemas que originan figuran: a) destrucción de paredes celulares, b) inactivación de enzimas, c) debilitamiento de la capacidad defensiva y d), alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético. Estas especies con oxígenos activos incluyen el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical óxido nítrico (NO)¹¹.

Cierta cantidad de superóxido se produce deliberadamente por células como fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos), dando lugar a grandes cantidades de este radical, como parte de los mecanismos de defensa del organismo, frente a las agresiones de diversa índole, tales como en las inflamaciones crónicas; pudiendo afectar los mecanismos normales de protección. Otro radical libre fisiológico es el óxido nítrico (NO), que es producido por el endotelio vascular como factor relajante y también por los fagocitos y el cerebro. El óxido nítrico, tiene muchas funciones fisiológicas útiles pero un exceso puede ser tóxico¹². Asimismo, existen moléculas que remueven los radicales libres por reacción directa (no catalítica) tales como: los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (Vitamina C). Cuando la defensa antioxidante no es cien por ciento eficiente, incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Se cree que muchos de los efectos secundarios de los medicamentos farmacéuticos se relacionan con un aumento en el daño oxidativo, causado por el exceso de radicales libres, los que producirían daño celular. Ante al estrés oxidativo severo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra¹¹.

Plantas con actividad antiinflamatoria: Es conocida la relación existente entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) en las enfermedades inflamatorias. Por lo que extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides, polifenoles y tocoferol con capacidad antioxidante, en muchas ocasiones a su vez presentan efecto antiinflamatorio. Algunos procesos inflamatorios son acompañados de anemia y hemorragias por la afectación local y sistémica del hierro en el área inflamada; aunque se piensa que, a pesar de su toxicidad local, la acumulación de hierro en áreas inflamadas

puede ser interpretada como un mecanismo protector contra la reacción de los radicales oxidativos inducidos por su metabolismo. Las plantas que contienen este y otros oligoelementos pueden contribuir con la actividad antioxidante y antiinflamatoria¹². Algunos ejemplos de plantas con actividad antiinflamatoria son: *Althaea officinalis* raíces de malvavisco son empleadas desde la antigüedad para contrarrestar las inflamaciones del aparato digestivo y junto con la vitamina E, provocan disminución de los procesos inflamatorios, además de presentar propiedad antioxidante marcada¹³ y *Bougainvillea xbuttiana* mostró tener diferentes efectos como antioxidante, antiinflamatorio y antinociceptivo en modelo murino^{14 y 15}.

1.2 Metabolitos secundarios de plantas medicinales que se les atribuye propiedades curativas.

Actualmente, se tiene el conocimiento de que muchos compuestos derivados de plantas, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario³.

El metabolismo secundario de origen vegetal es muy importante puesto que da lugar a productos (denominados metabolitos secundarios) que resultan de sumo interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario¹⁶. Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en cuatro grandes grupos:

1. Compuestos fenólicos y sus derivados

a. Flavonoides: Son compuestos fenólicos de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. En las plantas, estos metabolitos les confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. La asociación entre las plantas productoras de flavonoides y las diversas especies animales y otros organismos, puede explicar la gama extraordinaria de actividades bioquímicas y farmacológicas que estos productos ejercen en el hombre y otros mamíferos¹⁷.

Algunos efectos farmacológicos de los flavonoides de gran interés para el hombre es su actividad antiinflamatoria. En varios experimentos realizados en modelos animales se ha demostrado que algunos flavonoides inhiben la inflamación crónica a través de diversos mecanismos. Dichos compuestos, han mostrado actividad antioxidante y su efecto quelante de radicales, así como la capacidad de regular diversas actividades celulares, como la actividad enzimática de las ciclooxigenasas (COX). Por lo anterior, el efecto inhibitorio de los flavonoides sobre esta enzima se considera uno de los mecanismos antiinflamatorios celulares más importantes¹⁷.

El extracto acuoso de *Coptis japonica* Makino, una planta japonesa que contiene flavonoides como: geranina y corilagina son capaces de inhibir a concentración dosis dependiente, la producción de TNF- α en macrófagos estimulados con lipopolisacárido a una concentración media que va entre 15 a 60 μM ¹⁸.

b. Taninos: Desde el punto de vista biológico, los taninos son sustancias complejas producidas por las especies vegetales que cumplen funciones antisépticas o de conservación. Se producen en diversas partes de las plantas, como son: corteza, frutos, hojas, raíces y semillas; a pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas les da a los taninos diferencias en color, calidad y concentración. Los taninos son una mezcla heterogénea variable y compleja de compuestos químicos, de sabor amargo y astringente, pero en general son ésteres de un azúcar con un número variable de ácidos fenólicos¹⁸.

2. Terpenoides: Son compuestos secundarios que las plantas generan a partir de su metabolismo. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas, clorofilas y plastoquinoras, (de gran importancia en las estructuras de membranas). Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono)¹⁷.

Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroles derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 átomos de carbonos de la que se derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroles. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol. Estos compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc¹⁹. La especie *Conyza bonariensis*, comúnmente llamada canilla de venado, muestra tener un efecto antiinflamatorio y antimicótico en ensayos realizados con ratones albinos de la línea OF1¹⁷.

3. Saponinas: Son compuestos naturales, glicósidos de esteroides o triterpenoides caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar enlaces glucosídicos y éster. Se caracterizan por formar espuma en soluciones acuosas y por hemolizar glóbulos rojos. Las saponinas tienen un amplio rango de actividades biológicas como: acción antiinflamatoria, antimicótica, antiviral, hipocolesterolémica, antitrombótica y antidiurética¹⁶. Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que β -aescina una saponina encontrada en la semilla del Castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum L.*) posee actividades como: venotónicas, antiinflamatorias y antiedematosas. En modelos animales se ha puesto de manifiesto las propiedades antiinflamatorias de β -aescina mediante un proceso que parece estar relacionado con una disminución de la migración leucocitaria, así como la inhibición en la liberación de mediadores inflamatorios. Estos efectos también se han observado en pacientes humanos tras la administración intravenosa de 5 mg de β -aescina²⁰.

4. Compuestos nitrogenados o alcaloides: Son conocidos alrededor de 12,000 alcaloides que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados a partir de los aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina y la estricnina¹⁷.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios, parte del metabolismo primario de las plantas, del que se desvía acorde con las vías generales que se muestran en la Figura 1.

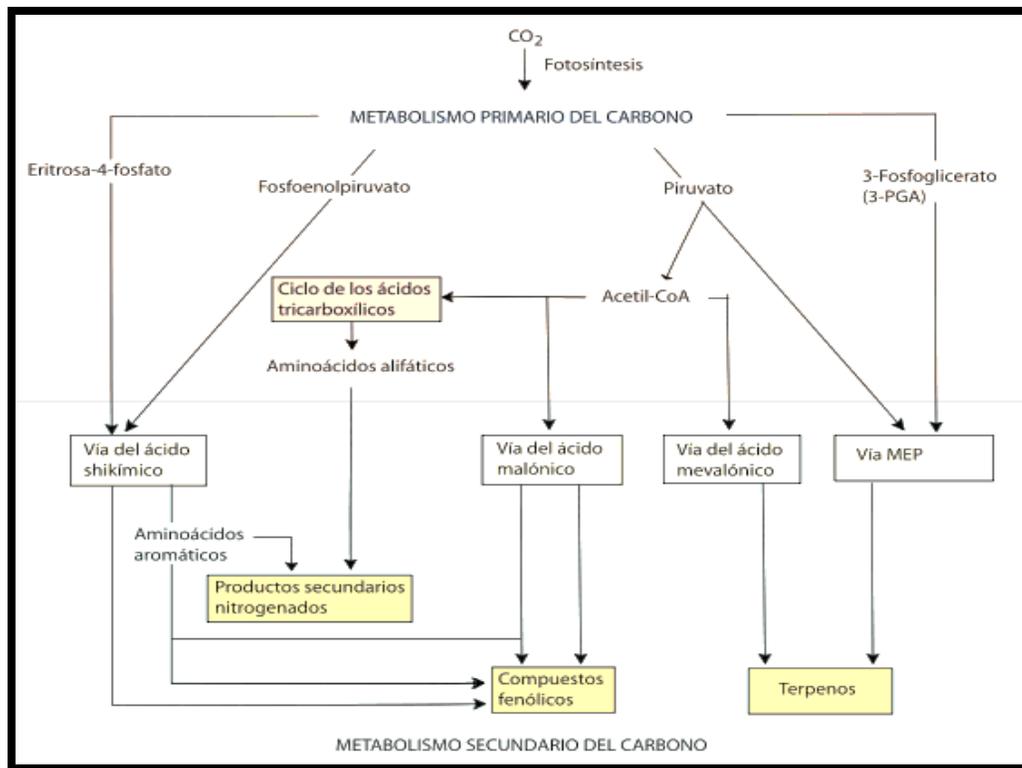


Figura 1: Biosíntesis de los metabolitos (Muñoz y col. 2012¹⁷).

Cabe destacar que los algunos metabolitos secundarios encontrados en las plantas medicinales poseen propiedades curativas ya que pueden disminuir o mejorar los síntomas de algunas enfermedades. En la Tabla 2 se resumen la actividad curativa de los metabolitos secundarios previamente descritos.

Tabla 2: Metabolitos secundarios y sus propiedades farmacológicas.

Metabolito secundario	Actividad Farmacológica
Flavonoides	Antioxidante y Antiinflamatoria ¹⁷ .
Taninos	Antiséptico y Cicatrizante ²¹ .
Terpenos	Antimicótico y Antiinflamatoria ²²
Saponinas	Antiinflamatoria, Antimicótica, Antiviral, Hipoglucemiante y Antitrombótica ¹⁶ .

1.3 Generalidades de *Bougainvillea*

El género *Bougainvillea* es una planta que pertenece a la familia *Nyctaginaceae*, tiene 17 especies aceptadas de las 35 descritas. La clasificación científica se encuentra descrita en la Tabla 3.

Tabla 3: Clasificación científica

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Orden</i>	<i>Caryophyllales</i>
<i>Familia</i>	<i>Nyctaginaceae</i>
<i>Tribu</i>	<i>Bougainvilleceae</i>
<i>Género</i>	<i>Bougainvillea</i>

Origen: Este arbusto proviene de Ecuador y del sur de Brasil²³.

Hábitat: Se le puede encontrar en jardines y los solares de preferencia en las zonas cálidas por qué no soportan las heladas invernales, además requiere de una exposición directa al sol y tolera periodos de sequía²³.

Distribución: Su distribución geográfica esta ubica en los continentes como: África (Burundi, Comores y Tanzania). En América (Bahamas, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Panamá, Puerto Rico, República Dominicana y Tobago)²³.

El género *Bougainvillea* posee una amplia actividad farmacológica como resumidamente descrita en la Tabla 4.

Tabla 4: Actividad Farmacológica del género *Bougainvillea*.

Actividad	Referencias
Analgésica	Rashid, 2013 ³⁰ , Alvarez y col., 2012 ¹⁵
Antiulserosa	Malairajan, 2002 ²⁴ ; Ars Pharm 2007 ²⁵ .
Antidiarreica	Ars Pharm. 2007 ²⁵ .
Antimicrobiana	Malomo, 2006 ²⁶ .
Antidiabética	Sikandar, 2006 ²⁷ ; Bhat, 2011 ²⁸ ; La Sociedad Americana de Nutrición y Ciencia 2004 ²⁹ .
Antihelmítica	Bhat, 2011 ²⁸ .
Antiinflamatoria	Rashid, 2013 ³⁰ .
Antitrombolítica	Adebayo, 2005 ³¹ .
Antiterogena	Qiming, 2003 ³² .
Antipiretica	Rashid, 2013 ³⁰ .
Antibacterial	Bates, 2000 ³³ .
Antioxante	Arteaga y col., 2014 ¹⁵ .
Captación de metales pesados.	Adebayo, 2005 ³¹ .

Bougainvillea xbuttiana es un híbrido entre dos especies del género *Bougainvillea* (*B. glabra* y *B. peruviana*)²³. En los estados del centro y sur del territorio mexicano se utilizan diversas especies de *Bougainvillea*, como: *B. spectabilis*, *B. glabra* y *B. buttiana*, para el tratamiento de afecciones respiratorias como tos, asma, bronquitis, gripa y tosferina. La parte más utilizada son sus flores y brácteas preparadas en cocimiento, el cual se administra por vía oral. En otros casos esta planta ha resultado eficaz para tratar la alferecía de niños, dolor de estómago, diarrea y acné. La infusión o el té de las hojas o flores se emplea para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias^{35 y 36}. Es una planta conocida popularmente como buganvilia, la cual tiene un cúmulo de brácteas (hojas modificadas) con tonalidades que van de las rosadas a las anaranjadas. Se conoce como arbusto trepador, pero puede ser podado y cultivado como planta de maceta, árbol pequeño o enredadera²³ (Fig. 2).



Figura 2: Diferentes colores de *B. xbutiana*

Los tallos son leñosos, de color verde oscuro y pueden ser pubescentes o glabros. Las hojas son de forma ovalada o acorazonada con ligera pubescencia en ambos lados, aunque puede haber diferencias en ellas, aun en la misma especie. Tiene espinas presentes en las axilas de muchas hojas, las cuales son rectas y de no más de 8 mm de largo. Las flores son de color blanco-cremoso y nacen comúnmente en grupos de tres, son pequeñas y tubulares; cada flor está sostenida por una bráctea (hoja modificada) muy llamativa y de colores diversos, la cual suele ser de forma redondeada en esta especie²³.

Composición química: Las hojas de *B. xbutiana* contienen flavonoides, saponinas, triterpenos, taninos y las brácteas contienen alcaloides²³ (Fig. 3).

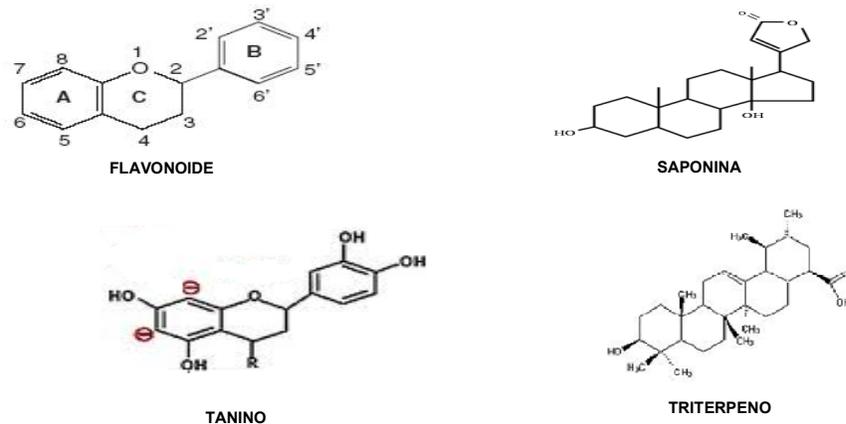


Figura 3: Diferentes metabolitos secundarios, presentes en *B. xbutiana* (Moore, 1998²³).

Respecto a utilidades para el ser humano, se ha visto que hay flavonoides que tienen actividades farmacológicas y protectoras para la salud. Se ha demostrado que algunos modulan el sistema inmune y las respuestas inflamatorias. También los hay con actividades anticancerígenas, antivirales, antitóxicas, y protectoras del hígado. Los extractos acuosos y etanólicos de flores y hojas del género *Bougainvillea* han sido mencionados por su carácter hepatoprotector, analgésico y antiinflamatorio¹⁴. La actividad inmunomoduladora está reportada en algunos extractos etanólicos³⁷. Adicionalmente, se ha demostrado una actividad antioxidante para el extracto etanólico de *B. xbutiana*¹⁵.

1.4 Generalidades sobre el proceso inflamatorio

Cuando las barreras externas de la inmunidad innata (piel y otras capas epiteliales) quedan dañadas, las respuestas innatas resultantes a la infección o lesión del tejido pueden inducir una cascada compleja de eventos conocida como proceso o respuesta inflamatoria. La inflamación puede ser aguda (efectos a corto plazo que contribuye a combatir infección, seguidos por curación) o puede ser crónica (a largo plazo, no resueltas), y contribuir a enfermedades como artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2³⁸.

Los datos característicos de una respuesta inflamatoria localizada fueron descritos por primera vez por el médico romano Celso durante el siglo I dC., como el *rubor et tumor cum calore et dolore* (enrojecimiento e hinchazón con aumento local de la temperatura y dolor). Otra marca de la inflamación agregada durante el siglo II por el médico Galeno es la pérdida de la función (*fuctio laesa*). En la actualidad se sabe que estos síntomas reflejan el aumento del diámetro vascular (vasodilatación), que da lugar a un incremento del volumen sanguíneo en el área. El volumen de sangre más alto calienta el tejido y lo hace que muestre enrojecimiento. La permeabilidad vascular también aumenta, lo que conduce al escape del líquido desde los vasos sanguíneos que da lugar a una acumulación de líquido (edema) que hincha el tejido. En el transcurso de algunas horas, también entran leucocitos al tejido provenientes de los vasos sanguíneos locales, estos datos característicos de las respuestas inflamatorias reflejan la activación de las células tisulares residentes (macrófagos,

mastocitos y células dendríticas) por Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) y Patrones Moleculares Asociadas a Daño (DAMP) para liberar quimiocinas, citocinas y otros mediadores solubles hacia la vecindad de la infección o herida. Los leucocitos reclutados son activados para que fagociten bacterias y restos y para que amplifiquen la respuesta al producir mediadores adicionales. La resolución de esta respuesta inflamatoria aguda incluye la eliminación de agentes patógenos invasores, y detritos; la activación de la fase sistémica y respuestas fisiológicas adicionales incluso el inicio de la cicatrización de heridas, y la inducción de las respuestas inmunitarias adaptativas. Sin embargo, en ausencia de la resolución o del daño del tejido, puede llevar a un estado inflamatorio crónico que puede causar más daño tisular local y en potencia tiene consecuencias sistémicas para el individuo afectado³⁸.

Cuando existe infección local, daño de tejido o exposición a algunas sustancias perjudiciales (como cristales de asbesto o sílice en los pulmones) las células centinelas que residen en la capa epitelial (macrófagos, células dendríticas y mastocitos) son activadas por PAMP, DAMP, cristales y otros para que empiecen a fagocitar los invasores perjudiciales. Las células también son activadas para liberar mediadores de la inmunidad innata que desencadenan una serie de procesos que constituyen colectivamente la respuesta inflamatoria³⁸.

El reclutamiento de diversas poblaciones de leucocitos hacia el sitio de infección o daño es un componente temprano crucial de respuestas inflamatorias. La señalización de receptores de reconocimiento a patrones (PRR) activa a macrófagos residentes, células dendríticas y mastocitos para que liberen los componentes iniciales de respuestas inmunitarias innatas celulares, incluso citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6; quimiocinas, prostaglandinas (después de la expresión inducida de la enzima COX2), e histamina y otros mediadores liberados por mastocitos. Estos factores actúan sobre las células endoteliales vasculares de vasos sanguíneos locales, lo que aumenta la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) y quimiocinas como la IL-8. Células que fluyen por los capilares locales son inducidas por quimioatrayentes y por interacciones con moléculas de adhesión para que se adhieran a las células endoteliales vasculares en la región, y pasen a través de las paredes de los capilares y hacia los espacios tisulares, un

proceso llamado extravasación. Los neutrófilos son los primeros en ser reclutados hacia el sitio de infección, donde aumentan respuestas innatas locales, seguidos por monocitos que se diferencian hacia macrófagos que participan en la eliminación de agentes patógenos y ayudan a la cicatrización de heridas³⁸.

Además, de estos eventos clave en el sitio de infección o daño, las citocinas sintetizadas en etapas tempranas en respuesta a estímulos innatos e inflamatorios (TNF- α , IL-1 e IL-6) también tienen efectos sistémicos. Inducen fiebre (una respuesta protectora, porque la temperatura corporal aumentada inhibe la replicación de algunos agentes patógenos) al inducir la expresión de COX2, que activa la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) actúa sobre el hipotálamo (el centro cerebral que controla la temperatura corporal), lo cual causa fiebre. Estas tres citocinas proinflamatorias también actúan sobre el hígado, e induce la respuesta de fase aguda, que contribuyen a la resolución de la respuesta inflamatoria³⁸.

El equilibrio entre las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria depende de un complejo entramado de señales entre citocinas. Los macrófagos responden a señales activadoras según patrones bien establecidos, pero mal comprendidos. Un determinado estímulo activa los macrófagos que responden produciendo y liberando citocinas inflamatorias (IL-1 y TNF- α) y, además, señales que condicionan el futuro de células CD4 Th0. Si el macrófago libera IL-12, CD4 Th0 compromete su destino hacia un fenotipo tipo 1 (CD4 Th1), que define una respuesta proinflamatoria que se traduce en la producción de IL-2, TNF- α e interferón γ (IFN- γ). Si los macrófagos responden al estímulo inicial liberando IL-15, CD4 Th0 compromete su destino hacia un fenotipo tipo 2 (CD4 Th2), que define una respuesta antiinflamatoria que se traduce en la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Además, cada tipo de respuesta bloquea la contraria, lo que potencia el efecto final. El resultado final de una respuesta tipo 1 será un cuadro, en principio, de defensa del organismo, y la de una respuesta de tipo 2 condicionará, a la postre, una situación de anergia. En la Figura 4 se presenta la regulación de los procesos inflamatorios³⁹.

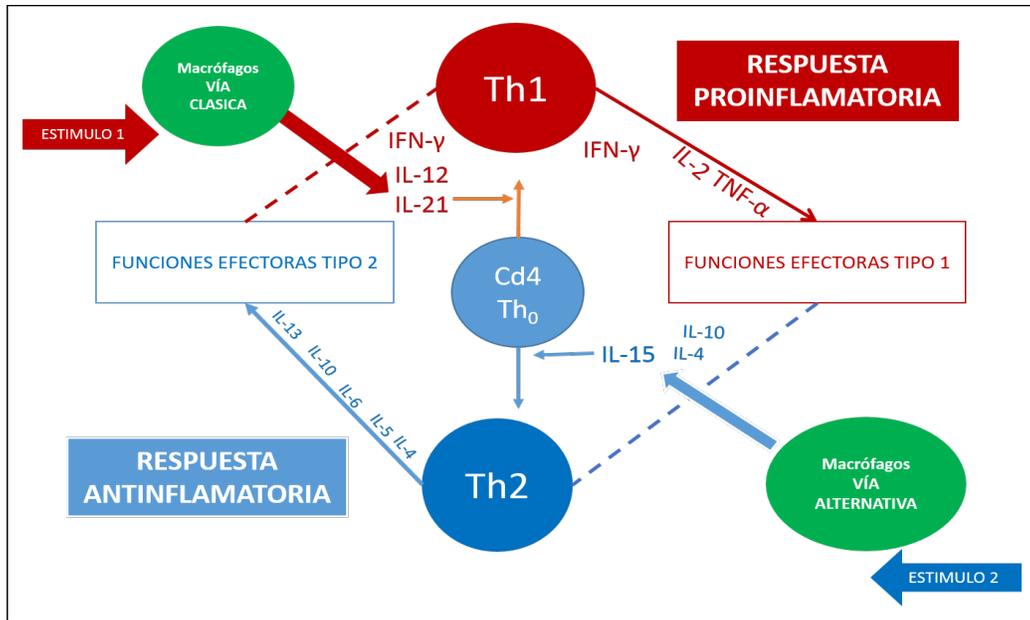


Figura 4: Equilibrio entre las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria (modificado de García, 2008³⁸)

Mediadores del proceso inflamatorio

Existen diversos compuestos endógenos que participan en la reacción inflamatoria y son conocidos como mediadores de este proceso. Dentro de estas sustancias se encuentran: aminas vasoactivas (histamina, serotonina, bradicinina), biolípidos, citocinas y óxido nítrico. En este trabajo se dará énfasis a las citocinas y óxido nítrico.

Citocinas: Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, que pesan entre 8 y 30 kDa. Se generan por medio de diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico. A diferencia de las hormonas clásicas, las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas, y actúan especialmente por mecanismos paracrino y autocrino. Ejercen funciones tales como inducir la multiplicación y diferenciación de otras células⁴⁰. Las citocinas pueden ser clasificadas en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Las pro-inflamatorias son las que participan en los eventos inflamatorios agudos y/o crónicos, como también se encuentran presentes en los procesos de reparación. Estas son factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 y IL-12⁴¹. Mientras que, las anti-inflamatorias son aquellas que regulan la respuesta

inflamatoria una vez controlada la infección y evitan que esta evolucione, como son a IL-10 y IL-4⁴¹.

Óxido nítrico (NO): Es un gas incoloro a temperatura ambiente y una de las moléculas conocidas de mayor simplicidad. Este ha sido implicado en una amplia variedad de mecanismos reguladores que van desde la vasodilatación y el control de la presión sanguínea hasta la neurotransmisión. Este radical libre ha sido involucrado en la inmunidad innata y participa en el complejo mecanismo de daño tisular como un mediador importante de los procesos inflamatorios y la apoptosis⁴². Se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), dicha enzima puede ser constitutiva cNOS o inducible iNOS, estas enzimas al interactuar con formas reactivas de oxígeno y moléculas biológicas forman una gran cantidad de productos finales, incluyendo nitritos y nitratos (NO_2^- , NO_3^-)⁴³.

Las funciones más importantes del NO en el organismo son: modulador del tono vascular, neurotransmisor central y periférico, agregación plaquetaria e inmunológica. En los sistemas biológicos el óxido nítrico se descompone en nitritos y nitratos. Esta descomposición puede ser regulada a través del aumento de las citocinas. Las modificaciones en la concentración de la producción de nitritos y nitratos se han asociado con diferentes condiciones fisiológicas⁴⁴.

Respuesta inmune: La respuesta inmune es subdividida en la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Los macrófagos y neutrófilos del sistema inmunitario innato constituyen una primera línea de defensa contra numerosos microorganismos comunes, y son esenciales para el control de abundantes infecciones bacterianas. Sin embargo, no siempre pueden eliminar los agentes infecciosos, existen algunos microorganismos patógenos que no son capaces de reconocer. Los linfocitos del sistema inmunitario adaptativo han evolucionado para dar origen a modos más versátiles de defensa que incrementan los niveles de protección frente a posibles re-infecciones por el mismo patógeno. Las células del sistema inmunitario innato desempeñan un papel esencial en la iniciación y posterior dirección de las respuestas adaptativas, a la vez que eliminan los agentes patógenos diana de la respuesta inmune adaptativa. Además, dado que existe un

retraso de 4 a 7 días antes de que la respuesta inmune adaptativa sea ejecutada, la respuesta inmune innata desempeña una función crucial⁴¹.

La inmunidad innata es la primera respuesta frente a un microorganismo extraño, mediante la cual se intenta eliminar la infección o contenerla hasta la aparición o el establecimiento de una respuesta inmune más específica y eficaz, la inmunidad adaptativa. No por ser la primera reacción frente a un patógeno, la inmunidad innata es sencilla o poco desarrollada. De hecho, algunos de los componentes de la inmunidad innata participan también en la inmunidad adaptativa, pero los mecanismos por los que se desarrolla la respuesta inmune son distintos como por ejemplo la activación del complemento. Los mecanismos de la inmunidad innata se caracterizan por ser inespecíficos: son incapaces de distinguir diferencias sutiles entre los agentes infecciosos, siendo sólo “específicos” para estructuras compartidas por grupos de microorganismos relacionados. Además, la respuesta inmune innata no presenta memoria inmunológica, es decir, reacciona igual en forma e intensidad a exposiciones repetidas del mismo agente o molécula extraños⁴⁵. En la Figura 5 se encuentran descritas los diferentes mecanismos externos a los que se exponen un agente patógeno.

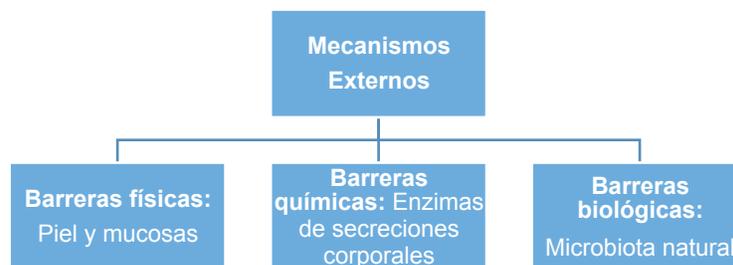


Figura 5: Mecanismos externos a los que se expone un agente patógeno (Charles y col., 2003⁴⁰)

1.5 Macrófagos e inmunidad

Los macrófagos, junto con los neutrófilos, participan en el desarrollo de la respuesta inmune innata ya que constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos y

generan una respuesta rápida e inespecífica (mediante fagocitosis, secreción de enzimas, citocinas, y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno). Además, los macrófagos y las células dendríticas coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa. El término macrófago fue acuñado por Aschoff en 1924 y proviene del griego “*makros*” grande y “*phagos*” comer, definiendo así al conjunto de células del sistema retículoendotelial que incluía monocitos, macrófagos, histiocitos, fibroblastos, células endoteliales y células reticulares⁴⁶.

Los macrófagos son células derivadas de precursores hematopoyéticos que en condiciones normales están presentes en todos los tejidos y mantienen la homeostasis y la integridad de los tejidos mediante la limpieza de los desechos celulares y de las células apoptóticas gracias a su alto potencial fagocítico, de degradación y a su capacidad para producir factores de crecimiento⁴⁷. Además de actuar como centinelas, tienen la capacidad de presentar antígenos a las células T durante la respuesta inmunitaria adaptativa, pero de forma menos eficiente que las células dendríticas. Aunque la mayoría de los macrófagos presentes en los tejidos derivan de los monocitos circulantes, existen pruebas de que pueden proliferar localmente en estado basal o en respuesta a daños específicos de tejido⁴⁷.

Los macrófagos se diferencian morfológica y fenotípicamente dependiendo del tejido en el que se encuentren y el entorno que los rodee. Expresan gran variedad de receptores de reconocimiento y presentan un metabolismo muy activo, siendo capaces de secretar gran cantidad de moléculas como enzimas proteolíticas, bactericidas, quimiocinas y citocinas. Además, son capaces de generar especies reactivas de oxígenos (ROS), de nitrógeno y metabolitos derivados del ácido araquidónico⁴⁷.

Origen: Todas las células del torrente sanguíneo proceden de un precursor común presente en la médula ósea, a partir del cual se diferencian y maduran siguiendo un proceso conocido como hematopoyesis. Dicho proceso parte de las capacidades autoregeneradora y diferenciadora de estas células precursoras pluripotente gracias a la cual se le consigue un cambio celular adecuado. Todos estos procesos se coordinan a través de la interacción con otras células y con componentes de la matriz extracelular del entorno, así como con factores solubles ya sean secretados localmente o provenientes del torrente sanguíneo⁴⁹.

En una primera fase de desarrollo de estas células sanguíneas, el precursor hematopoyético permanece en la médula ósea en estado quiescencia. En respuesta a factores de crecimiento específico, citocinas y hormonas, estas células experimentan en primer proceso de diferenciación que consiste en un direccionamiento por el cual la célula madre pierde su capacidad autoregeneradora y se diferencia a otra célula un poco más especializada que su predecesora pero que aún mantiene. A continuación, este precursor sufre un proceso de maduración gracias a la cual acabará de diferenciarse en un linaje celular específico. Existen diferentes factores de crecimiento, hormonas y citocinas solubles en el capaces de actuar sobre las células madre hematopoyéticas⁵⁰.

En una primera etapa en la médula ósea las IL-1, IL-3 e IL-6 inducen una división desigual en la célula progenitora hematopoyética que dará lugar a una nueva célula madre y una célula pluripotente mieloide llamada unidad formadora de colonia-granulocito/macrófago (GEMM-CFU) en presencia de IL-3, factor estimulador de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF), el cual a su vez se especializará en un precursor unidad formadora de colonia de macrófagos (M-CFU). A partir de este precursor M-CFU pueden derivarse tres vías de diferenciación: osteoclastos, células dendríticas mieloides o macrófagos. Para diferenciarse en la línea de macrófagos este precursor debe encontrarse en presencia de M-CSF gracias al cual la unidad de M-CFU se diferenciará primero en monoblasto, después en promonocito y por último en monocito. Una vez diferenciados en monocitos circulan por el torrente sanguíneo y son capaces de alcanzar cualquier parte del organismo a través del sistema periférico capilar, donde gracias a la interacción entre moléculas de adhesión como las integrinas y las selectinas podrán entre los tejidos⁵¹.

El monocito entra en la última etapa de diferenciación mediante la cual adquirirá ya la morfología y bioquímica propias de un macrófago, tales como un aumento del contenido lisosomal, de la cantidad de enzimas hidrolíticas y del número y tamaño de las mitocondrias, así como de su metabolismo energético y su capacidad fagocítica. A pesar de que estos macrófagos tisulares mantienen cierta capacidad proliferativa, la médula ósea de un individuo adulto produce aproximadamente 5×10^9 macrófagos al día. Si a esto sumamos el hecho de que la vida media de un macrófago tisular puede llegar a ser de varios

años, es crucial para el mantenimiento de la homeostasis que estas células sean capaces de entrar en apoptosis sin necesidad de recibir ningún tipo de estímulo⁵² (Fig. 6).

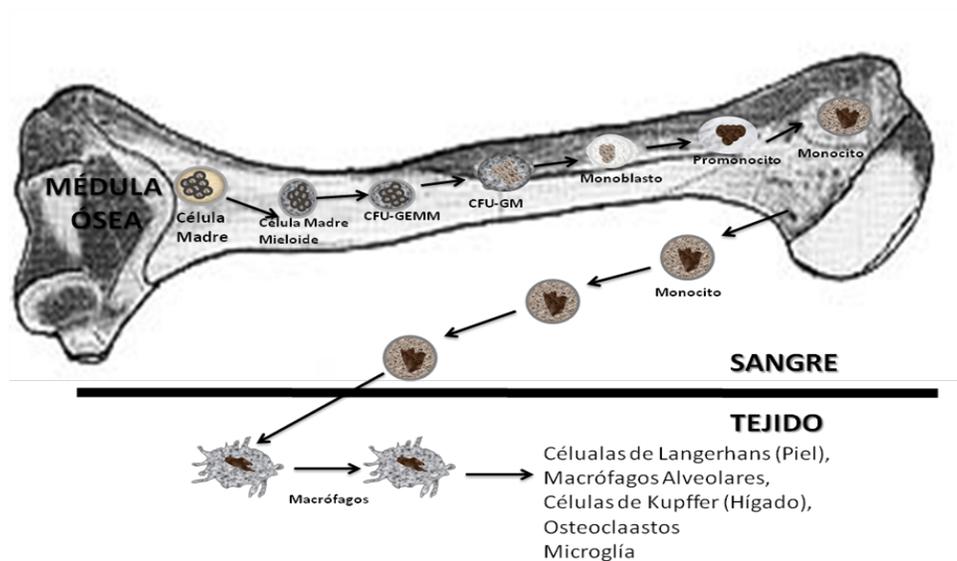


Figura 6: Diferenciación de célula madre a macrófago (Xaus y col., 2001⁵¹).

Polarización de macrófagos: La activación de los macrófagos es heterogénea, lo que refleja la plasticidad y versatilidad de estas células en respuesta a distintas señales. Esto se conoce como polarización de los macrófagos. Los términos M1 y M2 han sido utilizados para definir dos extremos del posible espectro de activación de los macrófagos. La respuesta M1 es la “activación clásica” proinflamatoria, mientras que la respuesta M2 es la “activación alternativa” antiinflamatoria⁵³.

La activación de los macrófagos, tanto clásica como alternativa, es un proceso complejo y finamente regulado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas que culminan con el aumento de la capacidad de la célula para ejercer sus funciones fisiológicas.

La importancia de los macrófagos en la respuesta inmune se ha reconocido desde hace muchos años y el rango de funciones asignadas a estas células ha crecido y seguirá creciendo a medida que nuevas tecnologías faciliten su estudio³⁹. Los macrófagos constituyen una población celular versátil, dinámica y con capacidad de reconocer una amplia gama de sustancias que inducen diversos estados de activación, múltiples funciones

microbicidas, de reparación de tejidos e inductora de angiogénesis. Se han descrito dos vías de activación de macrófagos diferentes: la “clásica” y la “alternativa” (Hortelano, 2014) (Fig. 7).

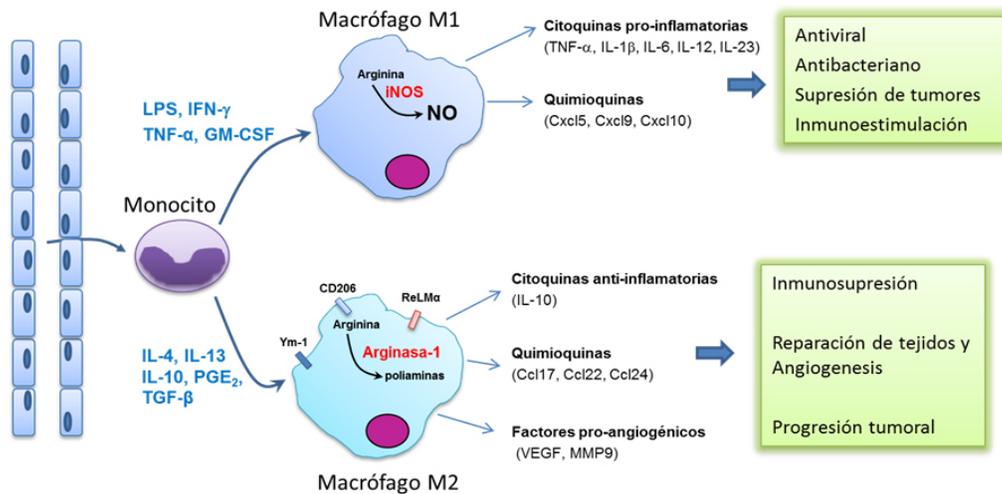


Figura 7: Activación de macrófagos (Hortelano, 2014⁵⁴)

Activación clásica: Este tipo de activación implica la exposición del macrófago a sustancias como el IFN-γ o lipopolisacárido (LPS) que son considerados como agentes inductores más potentes de este tipo de activación. Los macrófagos que se activan por esta vía muestran modificaciones en la expresión génica, en las rutas metabólicas, así como sus características morfológicas y funcionales. Estos cambios propician el aumento de la capacidad fagocítica, de procesamiento y presentación de antígenos, lisis de células tumorales, actividad bactericida (principalmente por especies reactivas de oxígeno y enzimas lisosómicas), eliminación de parásitos intracelulares, producción y secreción de IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), CD86, CD16, CD32, CD64 y la presentación antigénica asociada a linfocitos auxiliares tipo 1 (TH1). En general este tipo de activación está relacionada con estados inflamatorios. Sin embargo, un proceso inflamatorio persistente suele ser contraproducente ya que tiende a dañar los tejidos y en estos casos el sistema inmune debe desarrollar mecanismos antiinflamatorios⁵⁶ (Fig. 7).

Activación alternativa: Se ha demostrado que la activación alternativa se desencadena por las IL-4, IL-10, IL-13, factor transformador de crecimiento β (TGF- β) glucocorticoides y por ligando de receptores de *tipo Toll 4* (TLR 4), que dependen de aspectos tales como la concentración del inductor, la especie y el tejido de donde provienen los macrófagos, así como por su grado de diferenciación celular. Los macrófagos activados alternativamente poseen una elevada capacidad endocítica y fagocítica. Así, los macrófagos activados por esta vía son capaces de proteger los tejidos circulantes de procesos inflamatorios prolongados o de respuestas inmunes agresivas induciendo la reparación y/o modelación del tejido⁵⁶ (Fig. 7).

En una visión global de la respuesta inmunitaria, se observa que el macrófago, como célula efectora y fagocítica, es capaz de llevar a cabo la eliminación de agentes patógenos ya sea de manera directa mediante fagocitosis como indirecta a través de la activación de linfocitos T. Posteriormente, el propio macrófago es responsable de inducir la reparación de los daños causados durante la respuesta inflamatoria completando así la remodelación del tejido afectado y eliminando además cualquier residuo celular producido durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria⁵³.

Macrófagos en homeostasis y macrófagos en inflamación

En condiciones normales, los macrófagos están presentes en todos los tejidos manteniendo la homeostasis e integridad y actuando como centinelas, eliminando desechos celulares y células muertas. Los macrófagos se diferencian morfológica y funcionalmente dependiendo de cada tejido y constituyendo del 10 al 15% de las células en condiciones quiescentes, pudiendo aumentar en número bajo estímulos inflamatorios (Fig. 8).

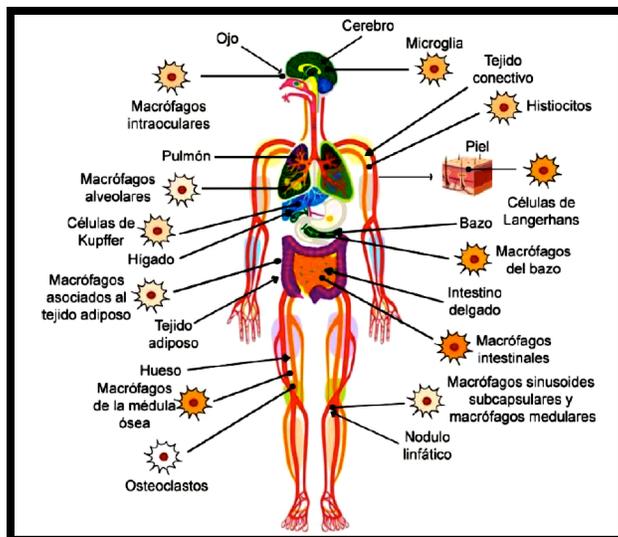


Figura 8: Nomenclatura y distribución tisular de macrófagos en homeostasis (Soler, 2015⁴⁵).

En condiciones homeostáticas *in vivo*, los macrófagos residentes en tejido también exhiben un estado de polarización variable que viene determinado por el microambiente tisular. Un ejemplo representativo son los macrófagos del hueso (osteoclastos) implicados en degradación del hueso; los macrófagos del cerebro (microglía) que contribuyen al desarrollo del circuito neuronal, la modulación de angiogénesis, y al balance de fluidos en el cerebro. Debido a su localización en las sinusoides hepáticas, las células de Kupffer entran en contacto con antígenos provenientes de tracto gastrointestinal por la vena porta y contribuyen a la detoxificación de bacterias, endotoxinas, “debris” celulares, células apoptóticas o agentes tóxicos como el etanol⁴⁶.

Respecto a la polarización de macrófagos en homeostasis, la existencia de macrófagos M2 productores de IL-10 se ha demostrado en pulmón e intestino, tejidos que están expuestos continuamente a sustancias potencialmente dañinas. Los macrófagos del pulmón (macrófagos alveolares) producen IL-10 de manera constitutiva mientras que su capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias es baja. Los macrófagos de otros tejidos también muestran perfil de polarización M2 en homeostasis: la microglía depende de la señalización a través de M-CSFR; las células de Kupffer, que constituyen entre el 80 - 90% de los macrófagos del organismo, son dependientes de la señalización por MCSF. En su conjunto, estas observaciones indican que los macrófagos muestran funciones efectoras

características de la polarización M2 en varios tejidos en condiciones basales y que el control de la polarización es fundamental en la homeostasis del tejido⁵⁷.

La polarización de macrófagos M1 predomina en los estadios iniciales de la respuesta inflamatoria, cuando la actividad citotóxica y dañina para el tejido es muy robusta. Más tarde, el número de los macrófagos de fenotipo M2 aumenta para promover la resolución de la inflamación, limitar la respuesta de tipo Th1 y promover el reclutamiento de células Th2. Este cambio en la polarización de los macrófagos se ha demostrado en el modelo murino de infección peritoneal por *L. monocytogenes*, donde al flujo inicial de monocitos pro-inflamatorios M1 le sigue (6 - 8 horas después) un aumento en monocitos M2 implicados en la resolución de la inflamación. Todavía no se ha determinado si los macrófagos pro-inflamatorios M1 se re-polarizan a macrófagos M2 en este modelo de peritonitis. En general, se acepta que la re-polarización M1 a M2 tiene lugar durante la inflamación y que la captura de células apoptóticas es el principal estímulo para que este cambio tenga lugar. Wei y colaboradores en el 2009 han demostrado que la señalización de esfingosina- 1-fosfato (S1P) derivado de células apoptóticas desencadena la expresión de la enzima hemo oxigenasa 1 (HMOX1) en los macrófagos, lo que promueve la polarización anti-inflamatoria M2. La ocurrencia secuencial de ambos estados de polarización se requiere para que la resolución de la inflamación sea adecuada y se alcance de nuevo la homeostasis tisular⁴⁶.

El desbalance entre el equilibrio M1/M2 o un inadecuado cambio en la polarización de los macrófagos en los tejidos inflamados da lugar a inflamación crónica como, por ejemplo, durante el desarrollo tumoral, enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, esclerosis múltiple), resistencia a insulina o patología cardiovascular asociada a la obesidad. En obesidad, los adipocitos liberan CCL2, TNF- α y ácidos grasos que promueven el reclutamiento y la activación de macrófagos de tejido adiposo a un fenotipo M1. La activación de macrófagos conduce a la inhibición de la vía de señalización de insulina y la activación de AP-1 y NF-kB (que conduce a mayor secreción de mediadores inflamatorios), y en consecuencia, a la resistencia a insulina. Los macrófagos de tejido adiposo de ratones y humanos muestran un perfil de polarización M1, mientras que los macrófagos de tejido adiposo de ratones delgados expresan genes asociados a polarización M2 como la IL-10

2.- JUSTIFICACIÓN

Las plantas con propiedades medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas. Hoy en día se ha convertido en un hecho científico universal que trasciende en el beneficio de la salud, es por esto que *Bougainvillea xbutiana* al ser utilizada en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades y conocer que el extracto etanólico de esta planta presenta actividad antinociceptiva y antiinflamatoria en modelo murino *in vivo*, así como actividad antioxidante. Además, se ha demostrado que presenta actividad inmunomoduladora en macrófagos peritoneales murinos. Por lo tanto, la realización de este trabajo permitirá caracterizar la vía de activación que siguen las células del sistema inmune como macrófagos al estimularlos con el extracto etanólico de *B. xbutiana*. Lo que resulta novedoso desde el punto de vista científico, ya que es muy poco el conocimiento que se tiene con respecto a la actividad sobre la respuesta inmune de los productos vegetales.

3.- HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el extracto de *Bougainvillea xbuttiana* posee propiedades antinociceptivas, antiinflamatorias, antioxidantes así como la capacidad de activar macrófagos murinos. Por lo cual es probable que el mecanismo de activación de células fagocíticas sea predominantemente antiinflamatorio al ser tratadas con el extracto etanólico de *Bougainvillea xbuttiana*.

4. OBJETIVOS

1. Objetivo General:

Determinar la vía de activación de macrófagos de ratones de la cepa BALB/c expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (variedad naranja).

Objetivos específicos:

1. Evaluar la citotoxicidad del extracto de *Bougainvillea xbuttiana* sobre los cultivos de macrófagos.
2. Determinar el estatus de activación de macrófagos en cultivo expuestos al extracto de *B. xbuttiana* a través de los ensayos de: vacuolización, producción de peróxido de hidrógeno, expansión celular y fagocitosis.
3. Evaluar la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos tratados con el extracto de *B. xbuttiana*.
4. Analizar la polarización de macrófagos expuestos al extracto de *B. xbuttiana* a través del perfil de citocinas predominantes y óxido nítrico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Ratones hembras de la cepa BALB/c con un peso corporal de entre 20-25 g se obtendrán del Bioterio ubicado en el Instituto de Salud Pública del Estado de Morelos. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas, temperatura de 23° C y con acceso libre a comida y agua⁵⁹. Los ensayos realizados con uso de animales se encuentran aprobados por el Comité de Cuidados de Animales, con el registro 005/2016.

Extracto: El extracto de *Bougainvillea xbuttiana* (*BxbE*) que se preparó y estandarizó como se describió en la solicitud para la patente (MX343163B). Un ejemplar de la planta fue identificado en el herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la UAEM, el número de registro de dicho ejemplar que se encuentra ahí depositado es el 23683. Resumidamente, se describe la obtención del extracto: las brácteas de las *B. xbuttiana* fueron colectadas, lavadas en agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se trituraron hasta la obtención de un polvo fino el cual se maceró en etanol al 50 % a 25 °C durante 7 días. Enseguida, el extracto fue filtrado a temperatura ambiente y secado en un evaporador y almacenado a 4 °C hasta el momento de uso.

Medio RPMI-1640 completo para cultivos celulares: El medio que se utilizó es RPMI-1640 está constituido por: 10 mM de ácido hidroxietil piperazinil etano sulfónico (HEPES), 2.8 % de carbonato de sodio, 10 % de suero fetal bovino (SFB), que fueron adquiridos por (Sigma Chemical Co. St, Louis, EUA) y 20 mg de gentamicina. Todos los reactivos fueron filtrados en una membrana Millipore 0.22 µm y almacenados a 4 °C.

Preparación de cultivos celulares

Macrófagos Peritoneales: Los macrófagos se obtuvieron en acuerdo al método descrito por Cohn y Benson (1965). En resumen: los animales fueron anestesiados y la cavidad peritoneal de cada ratón fue lavada con medio RPMI-1640. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 500 rpm por 5 minutos, el sedimento celular fue resuspendido a una concentración 1×10^6 células/mL, en medio RPMI-1640 completo y se distribuyó en microplaca de 96 pozos. Después de una incubación por 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, las

células no adherentes fueron removidas a través de lavado, y las células adheridas se consideraron como macrófagos peritoneales, los cuales fueron estimulados con diferentes tratamientos, como describe en la Tabla 5. Todos los diferentes grupos de cultivos de macrófagos fueron incubados a 37 ° C con 5% de CO₂⁶¹, y en distintos intervalos de tiempo fueron colectados los sobrenadantes y fueron conservados a -20 °C, hasta el momento de determinar los mediadores.

Tabla 5: Estimulación de macrófagos y terminología adoptada.

Estimulación de macrófagos	Terminología
Macrófagos control	Control
Macrófagos expuestos a 120 µg/100 µL del extracto	<i>BxbE</i>
Macrófagos expuestos a 10 µg/100 µL de LPS	M1
Macrófagos expuestos a 10 ng/ 100 µL de IL-4	M2a
Macrófagos expuestos a 10 ng/ 100 µL de IL-10	M2c

Determinación de la citotoxicidad: Los macrófagos peritoneales obtenidos como anteriormente se describió, fueron divididos en 6 grupos y expuestos a varios tratamientos. Se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ y en distintos intervalos de tiempo de incubación se colectaron los sobrenadantes y las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta 0.2 % en 20 % de metanol. La absorbancia se determinó con un filtro de 655 nm. El porcentaje de citotoxicidad se calculó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 1 - (\text{Abs.M} / \text{Abs.C}) \times 100$$

Donde:

Abs. M = Absorbancia Muestra, Abs. C = Absorbancia Control.

Ensayos para determinar el estado funcional de macrófagos peritoneales en cultivo

Determinación de la vacuolización: Los macrófagos peritoneales se obtuvieron como anteriormente se mencionó, fueron expuestos a diferentes tratamientos e incubados con medio RPMI-1640 completo, y el porcentaje de vacuolización se determinó de acuerdo al método descrito por Bernard y col, (1995). Después de distintos períodos de incubación, los sobrenadantes fueron removidos y a los cultivos se le adicionaron 100 μ L del colorante rojo neutro, constituido por 0.05 g de rojo neutro en 100 mL de PBS y reincubados por 30 min a 37° C y 5% de CO₂. Enseguida, se extrajeron el colorante y se adicionó 100 μ L de metanol. Se determinó la absorbancia en un lector de microplacas con un filtro de 570 nm de longitud de onda. El porcentaje de vacuolización se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Vacuolización} = (\text{Abs. M} / \text{Abs. C}) - 1 \times 100$$

Dónde: Abs. M= Absorbancia Muestra; Abs. C= Absorbancia Control.

Determinación del peróxido de hidrogeno (H₂O₂): Los macrófagos peritoneales que se obtuvieron como anteriormente se describió, se incubaron con distintos tratamientos y se distribuyeron en microplacas de 96 pozos a 37° C y 5% de CO₂. La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó directamente sobre las células de acuerdo con el método descrito por Pick y Mizel (1981). Se agregaron 100 μ L del colorante rojo de fenol constituido por: 0.1 %, 140 mM de NaCl, 10 mM, K₂PO₄, suplementado con peroxidasa al 5.5 mM. Los cultivos se reincubaron por 1 hora a 37° C y 5 % de CO₂ y enseguida, se le adicionaron 10 μ L de NaOH al 0.1 M. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas con un filtro de 620 nm. Los resultados se expresaron en μ M y se determinó por comparación con la curva estándar que se realizó con peróxido de hidrógeno.

Ensayo de expansión celular: El ensayo de expansión celular se realizó como lo describió Arruda y col. (2004). Se prepararon en microplacas de 6 pozos con cubre objetos y se les agregó un volumen de 1.0×10^5 células por pozo. Posterior a las 2 horas de incubación a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂, los cultivos celulares fueron lavados para la eliminación de las células no adheridas. Enseguida, sobre los cultivos se les adicionó los tratamientos anteriormente mencionados y se incubaron en las mismas condiciones. En

diferentes tiempos se colectó el sobrenadante y los cubre objetos fueron teñidos con cristal violeta durante 20 segundos. Las células expandidas fueron determinadas en el microscopio con un aumento de 40X. Los resultados se expresaron en porcentaje, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Expansión celular} = (\text{Núm. de células expandidas} / \text{Núm. de células totales}) \times 100$$

Ensayo de fagocitosis: El ensayo de fagocitosis de levadura se realizó como lo describió Zebedee y col., (1994). Enseguida, se describe la obtención del suero y opsonización de la levadura.

Obtención del suero: Grupos de ratones controles se sangraron a través del plexo venoso retro orbital y la sangre obtenida se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se centrifugó la sangre a 1000 rpm. por 5 minutos y se colectó el suero que se usó para la opsonización de la levadura.

Opsonización de la levadura: Las levaduras de la cepa *Sacharomyces cerevisiae* Z-37 Ferring se incubaron con el suero obtenido como se describió anteriormente durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Después de 2 lavados con PSB pH 7.4 las levaduras se resuspendieron en 1 mL de PBS y se utilizó una MOI de 5 para todos los ensayos.

Preparación de macrófagos: Resumidamente, en una microplaca de 6 pozos, se colocaron cubre objetos y se le agregó un volumen de 1.0×10^5 células/pozo que se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Después de 2 horas de incubación, se realizaron lavados en las células para la eliminación de las no adherentes y se trataron con los diferentes tratamientos antes mencionados. En diferentes periodos de tiempo las células anteriormente tratadas, fueron lavadas 2 veces con PBS y se le adicionó las suspensiones de levaduras opsonizadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 5, se incubaron por 90 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS y se le adicionó metanol absoluto durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se tiñeron con safranina acuosa durante 35 segundos y el exceso de colorante fue removido con agua destilada. Los resultados se presentaron como índice fagocítico y se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{Núm. de células con levadura}}{\text{Núm. de células totales}}$$

Determinación de mediadores inflamatorios

Los mediadores presentes en las muestras de sobrenadantes de macrófagos peritoneales obtenidos y sometidos a los diferentes tratamientos como anteriormente se describió se determinaron por el método de ELISA y por el ensayo biológico.

Determinación de citocinas por el método de ELISA: La determinación de las citocinas se realizó por el método descrito por Schumacher y col., (1998). Resumidamente, las microplacas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 2 µg/mL de anticuerpo de captura anti-ratón por 6 horas a temperatura ambiente. Los sitios libres de cada pozo se bloquearon a través de la adición 100 µL de PBS constituido por 10 % de SFB y 3 % de albúmina sérica (BSA). Posteriormente, las microplacas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se le adicionó 50 µL de muestra experimental y/o controles por triplicado. Las microplacas se incubaron a 4 °C por 18 horas, y enseguida se le adicionó 1 µg/mL del anticuerpo de detección marcado con biotina y las microplacas fueron reincubadas por 45 minutos a temperatura ambiente. Después se le adicionó avidin-peroxidasa, diluida 1:400 en PBS suplementado con 10 % de SFB y se le adicionó 100 µL de solución conteniendo 0.3 mg/mL de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazona-6-ácido sulfónico) (ABTS) en ácido cítrico 0.1 M y peróxido de hidrógeno. La reacción se interrumpió de 10 a 80 minutos por la adición de SDS/N, N-dimetil formamida (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA), y la absorbancia se determinó en el lector de microplacas, con un filtro de 405 nm de longitud de onda. En la Tabla 6 se encuentran descritos los anticuerpos monoclonales de captura anti-ratón y de detección marcados con biotina, que fueron utilizados para las diferentes citocinas tituladas por el método de ELISA.

Tabla 6: Anticuerpos monoclonales de captura y de detección marcados con biotina utilizados para la titulación de las diferentes interleucinas

INTERLEUCINAS	ANTICUERPOS MONOCLONALES DE CAPTURA	ANTICUERPOS MONOCLONALES DE DETECCIÓN	ANTICUERPOS MARCADOS CON BIOTINA
Interleucina 1β (IL-1β)	IL-1 β	ANTI-IL-1 β (B122)	B22
Interleucina 4(IL-4)	IL-4	ANTI-IL-4 (BVD4-1D11)	BVD6-24G2
Interleucina (IL-1β)	IL-5	ANTI-IL-5 (TRFK5)	TRFD6-24G2
Interleucina (IL-1β)	IL-6-	ANTI-IL-6- (MP5-20F3)	MP5-32-C11
Interleucina (IL-1β)	IL-10	ANTI- IL-10 (JESS-16E3)	(SXC-1)
Interferón gama (IFN-γ)	IFN- γ	ANTI-IFN- γ RA-6A2	XM612
Factor Transformador de Crecimiento beta (TGF-β)	TGF- β	ANTI-TGF- β A75-2	A75-3

Detección de TNF- α por el método biológico: Los niveles de TNF presentes en los sobrenadantes de cultivos experimentales y controles se titularon de acuerdo con el método descrito por Ruff y Gifford, (1980). Las células L-929 (fibroblastos de ratones de la cepa CH3) fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio RPMI 1640 completo, homogenizadas y sembradas en microplacas de 96 pozos a una concentración de 3-5 X 10⁶ células/mL. Los cultivos fueron incubados a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ por 18 horas. Después de ese tiempo, el medio de cultivo fue removido y se agregaron 50 μ L por pozo de medio RPMI 1640 completo. A la primera fila de la microplaca se le agregaron 25 μ L de las

muestras experimentales y/o muestras control, que se probaron por triplicado. En seguida se le adicionó 50 µL de RPMI 1640 completo suplementado con actinomicina D (1.0 µL/mL). Las placas se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ por 18 horas. Después de este período de incubación, el medio de cultivo de las placas fue retirado y lavado con PBS. Posteriormente, las células se fijaron y tiñeron con una de solución cristal violeta 0.02 % en metanol al 20 % por 15 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante absorbido por las células fijadas se removió a través de lavados con agua y se le adicionaron 100 µL de metanol. La absorbancia se determinó directamente en la placa utilizando un lector de microplacas con un filtro de 620 nm. Los resultados se calcularon por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 1 - (\text{Abs.M} / \text{Abs.C}) \times 100$$

Donde:

Abs. M= Absorbancia Muestra; Abs. C= Absorbancia Control.

Los resultados se expresaron en pg/10⁶ células y comparados con la curva estándar de TNF recombinante (Boehringer Mannheim, Alemania).

Determinación de óxido nítrico (NO): Los niveles de NO₂⁻ presentes en los sobrenadantes de macrófagos experimentales y/o controles fueron determinados por la combinación de 50 µL del sobrenadante de la muestra con 50 µL de reactivo de Griess. Este reactivo se preparó con sulfanilamida 0.1%, N'naftiletilenodiamina (NAP) 1.0 % (Sigma Chemical Co. St Lois, EUA) y ácido fosfórico 3 %⁶⁷. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia con un filtro de 540 nm de longitud de onda en un lector de microplacas. Los resultados se expresaron en µM/10⁶ células y fueron comparados con una curva estándar de nitrito de sodio (Sigma Chemical Co. St Lois, EUA). Los niveles mínimos detectados en las condiciones experimentales serán 1 µM/10⁶ células.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media +/- desviación estándar de 4 repeticiones por ensayo. La evaluación estadística se realizó por el análisis de la prueba de “t” de Student y los valores significativos fueron ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

Análisis Físicoquímico del extracto etanólico de *Bougainvillea xbutiana*. El perfil cromatográfico del *BxbE*, realizado en Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), mostró la presencia de 9 compuestos (Fig. 9).

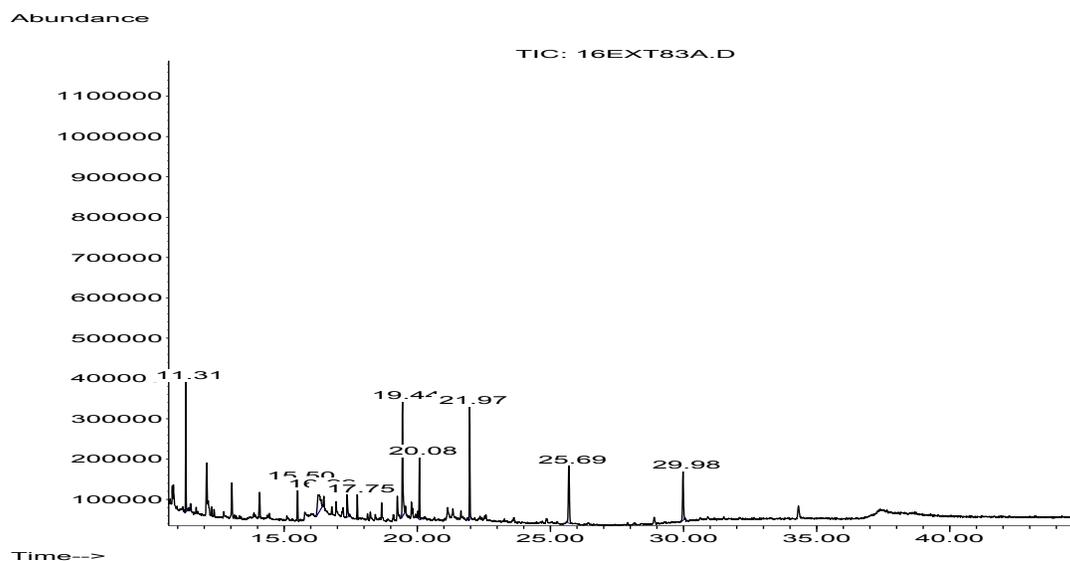
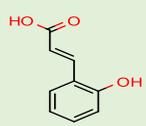
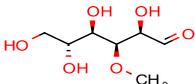
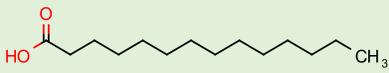
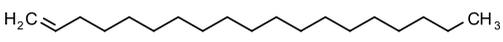
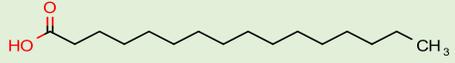
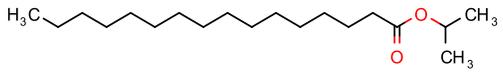
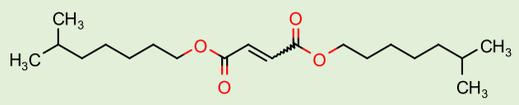
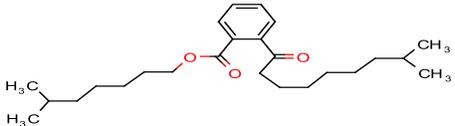
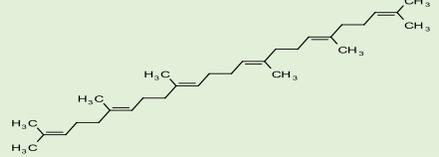


Figura 9: Cromatograma del extracto de *Bougainvillea xbutiana*. Cromatografía de gases acoplada a masas realizada como descrita en Materiales y Métodos.

En la Tabla 7 se encuentran descritos las estructuras, los tiempos de retención, peso molecular y actividades biológicas de los compuestos presentes en el extracto *BxbE*. Entre los 9 compuestos presentes en el extracto de *Bougainvillea xbutiana*, dos de ellos tales como: el Ácido-3-(2-hydroxifenil)-(E)-2-Propiónico con un tiempo de retención de 11.3 minutos y un peso molecular de 74 g/mol, y el ácido-*n*-hexadecanoico con un tiempo de retención de 19,44 minutos y un peso molecular de 256.4 g/mol, son compuestos que de acuerdo a la literatura pertinente presentan actividades antiinflamatorias. Mientras que, los compuestos 3-O-Methyl-D-Glucosa, Ácido tetradecanoico, 1-Nonadeceno, Palmitato Isopropilo, Ácido diisocetil ester 1,2-Benzenedicarboxílico y Escualeno poseen actividades preservativas, analgésicas, antioxidantes y antinociceptivas. Para el compuesto Diisocetil maleato no se encontró hasta el momento actividad biológica.

Tabla 7. Descripción de los compuestos encontrados en el extracto de *Bougainvillea xbuttiana*.

Nombre del compuesto	Estructura	Tiempo Retención min	P. M g/mol	Actividad biológica
Ácido 3-(2-hydroxifenil)-, (E)- 2-Propenoico,		11.30	74.0	Antiinflamatorio (Amador y col., 2006 ⁶⁸).
3-O-Metil-d-glucosa		16.29	222.2	Analgésico y preservativo (Reyes, 2015 ⁶⁹).
Ácido Tetradecanoico		17.36	228.4	Antioxidante (Sancheza y col., 2002 ⁷⁰).
1-Nonadeceno		17.75	128.2	Analgesico (Perez, V., 2018 ⁷¹)
Ácido n-Hexadecanoico		19.44	256.4	Antiinflamatoria y antioxidante (Jimenez y col., 2013 ⁷²)
Palmitato Isopropilo		20.08	298.5	Antiinflamatoria (García y col., 2014 ⁷³)
Diisooctil maleato		21.96	340.5	No se ha reportado actividad biológica
Ácido diisooctil ester 1,2-Benzenedicarboxílico		25.69	390.6	Antimicrobiana. (Perez, MR., 2005 ⁷⁴).
Escualeno		29.98	410.7	Antiinflamatoria (Salas y col., 2008 ⁷⁵)

Efecto del extracto de *B. xbutiana* sobre la viabilidad celular de los macrófagos peritoneales.

Para evaluar el efecto citotóxico del extracto de *B. xbutiana*, los cultivos de macrófagos fueron expuestos al extracto y en diferentes intervalos de tiempo se determinaron los porcentajes de citotoxicidad. Estos porcentajes fueron comparados con los cultivos de macrófagos M1 polarizados por la estimulación con LPS y M2a y M2c por estimulación con IL-4 e IL-10, respectivamente.

La Figura 10 muestra los porcentajes de citotoxicidad de los grupos de cultivos de macrófagos sometidos a las diferentes estimulaciones. En los grupos de macrófagos expuestos al extracto de *B. xbutiana* y M1, los porcentajes de citotoxicidad fueron similares a las 48 horas de exposición (27.31 % y 32.715 %), disminuyendo con el tiempo de exposición. Para los cultivos de macrófagos M2a los mayores porcentajes de citotoxicidad fueron observados a las 4 y 12 horas, disminuyendo posteriormente. La Figura 10 también muestra que los macrófagos M2c, el mayor porcentaje de citotoxicidad fue de 14.45 % a las 4 horas de exposición, disminuyendo posteriormente. La exposición por 4 horas de los macrófagos M2c el porcentaje de citotoxicidad fue significativamente mayor cuando comparado con el grupo de macrófagos expuestos al extracto ($p < 0.005$). Estos porcentajes de citotoxicidad fueron significativamente mayores cuando comparados con los grupos de macrófagos tratados con el extracto ($p < 0.001$).

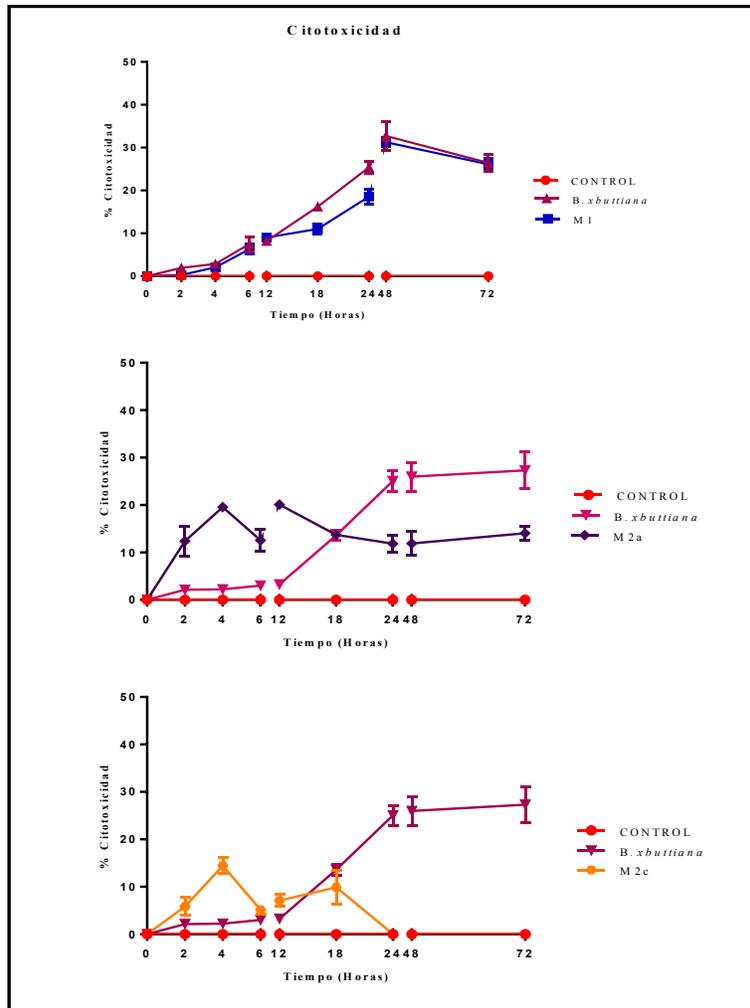


Figura 10: Porcentaje de citotoxicidad. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos, mantenidos y sometidos a diferentes tratamientos como se describe en materiales y métodos. Cada punto representa los valores medios \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.005$ *; $p < 0.001$ **).

Efecto del extracto de *B. xbutiana* sobre la activación de macrófagos.

Para determinar el estatus de activación de los cultivos de macrófagos expuestos al extracto fueron realizados los ensayos de: vacuolización, producción de peróxido de hidrógeno, expansión celular y fagocitosis. El estatus de activación de los macrófagos tratados con el extracto fue comparado con los macrófagos M1 polarizados estimulados con LPS macrófagos polarizados M2a y M2c estimulados con IL-4 y IL-10, respectivamente.

Cinética de formación de vacuolas. En la Figura 11 se encuentran descritos los resultados de los porcentajes de formación de vacuolas en los cultivos de macrófagos peritoneales sometidos a los diferentes tratamientos. En cultivos de células peritoneales expuestos a los diferentes tratamientos, la formación de vacuolas inició a las 2 horas. El mayor porcentaje de formación de vacuolas en los macrófagos expuestos al *BxbE* se observó a las 6 horas con un 62.589 %, disminuyendo con el tiempo de exposición. La evaluación de la polarización de los macrófagos M1 por la estimulación con LPS mostró que el mayor porcentaje de formación de vacuolas se observó a las 12 horas (43.216 %), con posterior disminución. Para los cultivos de macrófagos M2a y/o M2c polarizados por la estimulación con IL-4 y/o IL-10, respectivamente, los mayores porcentajes de vacuolización se observaron a las 12 horas, con 44.43 % y 39.25 %, respectivamente, con posterior disminución. Los porcentajes de vacuolización en los grupos de macrófagos M1 y M2 fueron significativamente menores cuando comparados con los cultivos de macrófagos expuestos al *BxbE* ($p < 0.02$, $p < 0.05$) (Fig. 11).

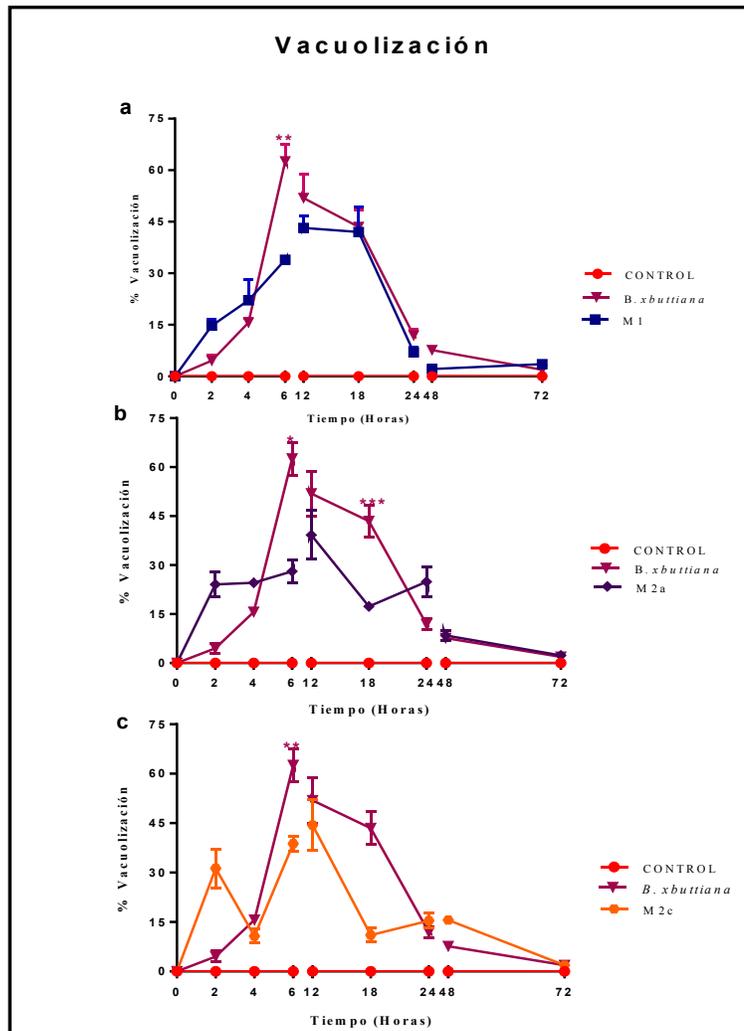


Figura 11: Porcentaje de formación de vacuolas. Los macrófagos fueron obtenidos y sometidos a diferentes tratamientos. La figura describe el porcentaje de vacuolización obtenido de los cultivos de macrófagos expuestos a los distintos tratamientos como se describe en materiales y métodos. Cada punto representa los valores medios \pm de las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.05^*$; $p < 0.02^{**}$).

Producción de peróxido de hidrógeno. La Figura 12 muestra los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en los cultivos de macrófagos polarizados o no por la exposición a los diferentes tratamientos. En todos los cultivos de macrófagos aquí estudiados la producción de peróxido de hidrógeno empezó a partir de las 2 horas de exposición. Los mayores niveles de peróxido de hidrógeno producidos en los cultivos de macrófagos expuestos al *BxbE* fueron observados a las 24 horas. Para los grupos de macrófagos M1 y M2, los mayores niveles de peróxido de hidrógeno fueron observados a las 6 y 4 horas,

respectivamente. Los niveles de peróxido de hidrógeno obtenidos en los cultivos de macrófagos expuestos al extracto fueron significativamente mayores cuando comparados con aquellos resultados obtenidos de los cultivos de macrófagos M1 y M2 ($p < 0.05$ y 0.01).

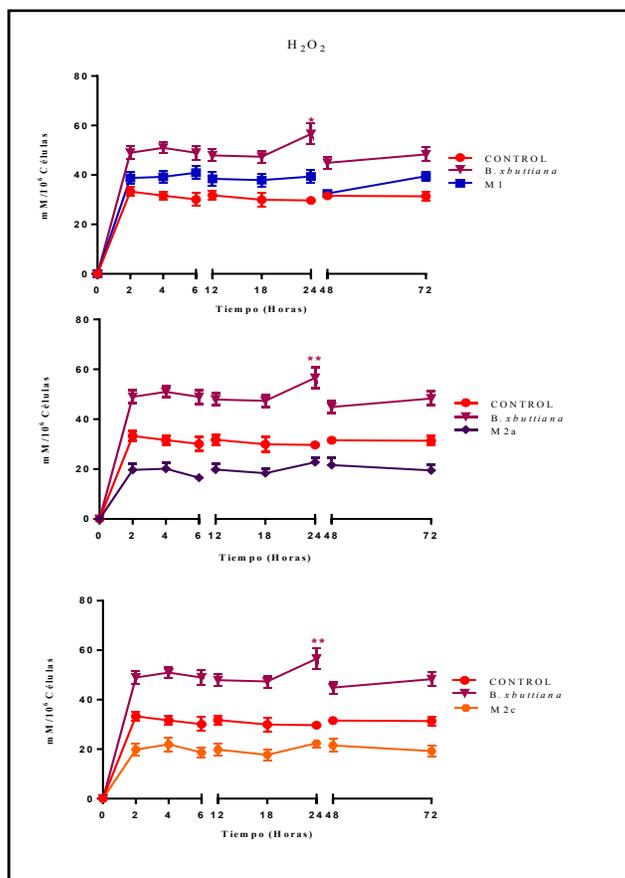


Figura 12: Producción de peróxido de hidrógeno. Los macrófagos fueron obtenidos, mantenidos y sometidos a diferentes tratamientos y se cuantificó directamente H₂O₂ presente en los cultivos de macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos como se describe en materiales y métodos. Cada punto representa los valores medios \pm de las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Expansión de los macrófagos peritoneales. En la Figura 13 se encuentra descrita el porcentaje de expansión de macrófagos peritoneales expuestos a los distintos tratamientos. En los cultivos de macrófagos peritoneales la expansión celular se registra desde las 2 horas de exposición a los distintos tratamientos. Los macrófagos expuestos a *BxbE* y los macrófagos M1 los porcentajes de expansión celular fueron similares. Para los cultivos de macrófagos M2a y M2c estimulados con IL-4 e IL-10 los mayores porcentajes de expansión celular fueron observados a las 6 y 12 horas, respectivamente. Los porcentajes

de expansión celular en los grupos de macrófagos expuestos *al BxbE* y los macrófagos M1 fueron significativamente mayores cuando comparados con aquellos resultados obtenidos de macrófagos M2 ($p < 0.001$) (Fig. 13).

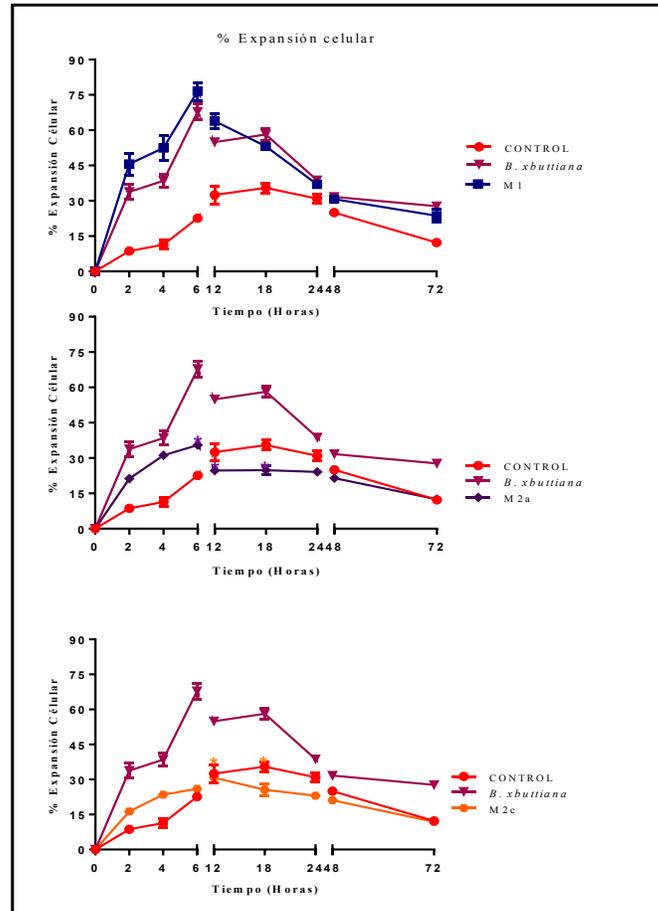


Figura 13: Porcentaje de expansión celular. Los macrófagos fueron obtenidos y sometidos a diferentes tratamientos. Cada punto representa los valores medios \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos diferentes ($p < 0.001^*$). En todos los experimentos la desviación estándar fue menor al 5 % y por lo tanto no se observan en las gráficas.

La velocidad de expansión celular de los cultivos de macrófagos peritoneales expuestos a los diferentes tratamientos se determinó mediante el porcentaje de expansión celular de los macrófagos dividido por el tiempo de exposición a los distintos tratamientos. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la velocidad de expansión de los macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos. Las mayores velocidades de expansión fueron observadas después de 2 horas en todos los diferentes tratamientos, disminuyendo

posteriormente. En los cultivos de macrófagos M1 expuestos al LPS la velocidad de expansión celular fue significativamente mayor ($p < 0.001$) cuando comparada a aquellas velocidades obtenidas en los cultivos expuestos al extracto y/o a las interleucinas. Las velocidades de expansión celular obtenidas de los cultivos de macrófagos M2a y M2b expuestos a las interleucinas fueron significativamente menores cuando comparadas a aquellas obtenidas de los cultivos expuestos al extracto *BxbE* ($p < 0.001$).

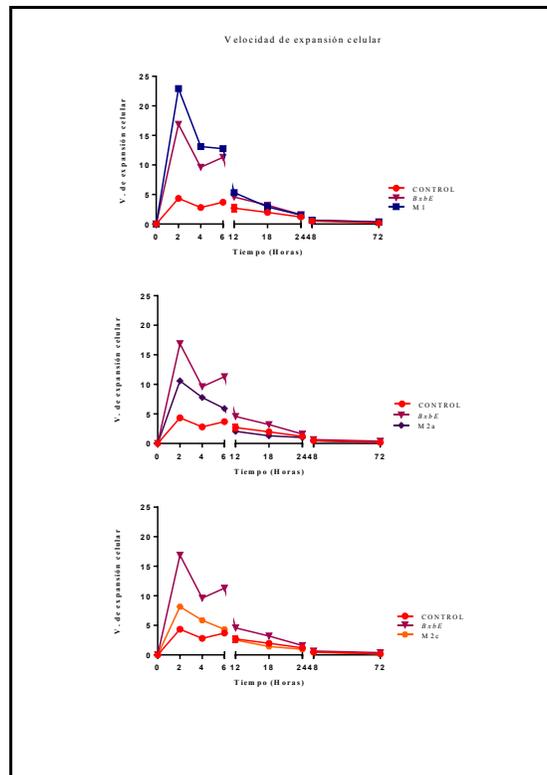


Figura 14: Velocidad expansión celular. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos y sometidos a los diferentes tratamientos. La velocidad de expansión celular se determinó directamente a través del porcentaje de expansión celular. Cada punto representa los valores de \pm la desviación estándar de 3 experimentos ($p < 0.001^*$). En todos los experimentos la desviación estándar fue menor al 5 % y por lo tanto no se observan en las gráficas.

Cinética de la fagocitosis de los macrófagos peritoneales. En la Figura 15 se encuentra descrito el porcentaje de fagocitosis de los macrófagos peritoneales expuestos a los distintos tratamientos. Los mayores porcentajes de fagocitosis en los cultivos de macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos fueron observados a las 6 horas. En los cultivos celulares expuestos al extracto de *BxbE* y macrófagos M1 expuestos al LPS, el

porcentaje de fagocitosis es similar. Al contrario, en cultivos de macrófagos M2a y M2c expuestos a las IL-4 y IL-10, los porcentajes de fagocitosis fueron significativamente menores cuando los comparamos con el porcentaje de fagocitosis obtenidos en los macrófagos expuestos al *BxbE* para los ($p < 0.01$ y $p < 0.02$, respectivamente).

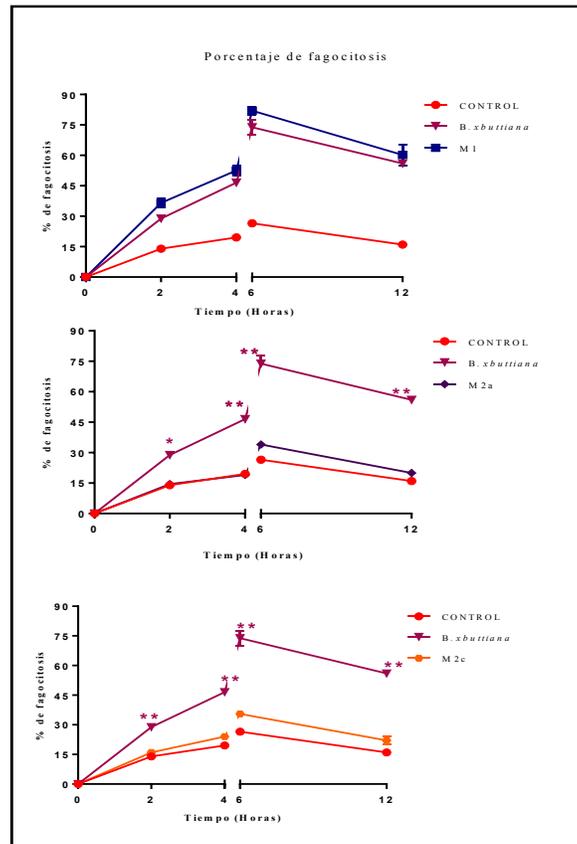


Figura 15: Porcentaje de fagocitosis. Fueron mantenidos y sometidos a los diferentes tratamientos en diferentes intervalos de tiempo se les agregó levadura opsonizada durante 90 min, como se describió en materiales y métodos. Cada punto representa los valores medios \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos diferentes ($p < 0.02$ * y $p < 0.01$ **).

La velocidad de fagocitosis se determinó directamente de los resultados obtenidos del porcentaje de fagocitosis el cual se dividió entre el tiempo de exposición a los diferentes tratamientos descritos anteriormente. En la Figura 16 se observa que los macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos la mayor velocidad fagocítica fue obtenida a las 2 horas de exposición y disminuye en tiempos posteriores. En cultivos de macrófagos M1

expuestos a LPS y *BxbE* la velocidad fagocítica fue similar para todos los tiempos de exposición. Al contrario, en los cultivos celulares M2a y M2c expuestos a las IL-4 e IL-10 las velocidades fagocíticas fueron significativamente menores cuando comparamos con aquellas velocidades obtenidas de los cultivos celulares expuestos a *BxbE* ($p < 0.02$ y $p < 0.01$, respectivamente).

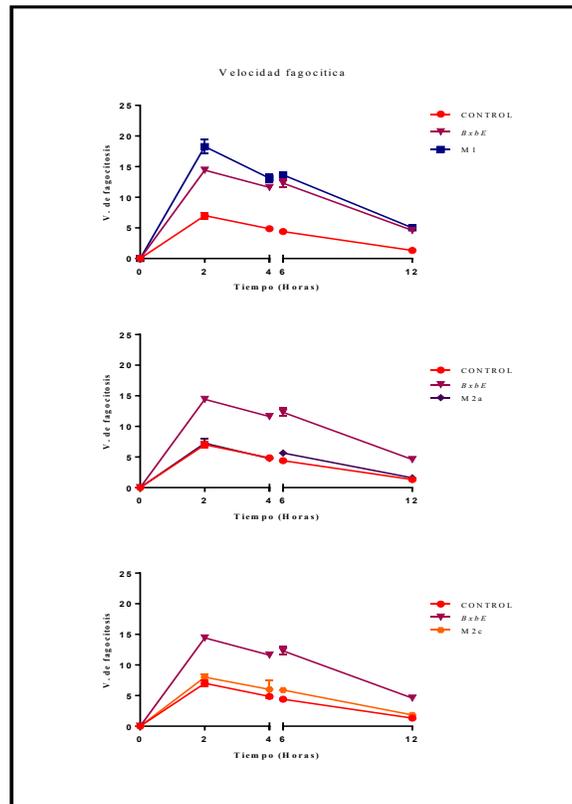


Figura 16: Velocidad fagocítica. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos y sometidos a los diferentes tratamientos. La velocidad de fagocitosis se determinó directamente a través del porcentaje de fagocitosis. Cada punto representa los valores de \pm la desviación estándar de 3 experimentos ($p < 0.02^*$; $p < 0.01^{**}$). En todos los experimentos la desviación estándar fue menor al 5 % y por lo tanto no se observan en las gráficas.

Efecto del extracto *Bougainvillea xbuttiana* sobre la producción de mediadores.

El efecto del extracto de *B. xbuttiana* sobre la producción de los mediadores fue comparado con los macrófagos M1 estimulados con LPS y con macrófagos M2a y M2c estimulados con IL-4 e IL-10. Para estos ensayos los cultivos celulares fueron obtenidos, mantenidos y tratados como se describió anteriormente.

Producción de TNF. Los niveles de TNF- α presentes en los cultivos de macrófagos expuestos al extracto *BxbE*, en los macrófagos M1 expuestos al LPS y macrófagos M2a y M2c expuestos a la IL-4 e IL-10 se encuentran descritos en la Figura 17.

La producción de TNF- α , en los macrófagos M1 expuestos a LPS empieza a aparecer a partir de 2 horas de exposición, alcanzando su máximo entre las 6 y 12 horas, disminuyendo posteriormente. Los niveles de TNF- α obtenidos en los cultivos de macrófagos M1 fueron significativamente mayores cuando comparados con los niveles de TNF- α presentes por los macrófagos expuestos al extracto de *BxbE* ($p < 0.01$). Mientras que, los niveles de TNF- α liberados por los macrófagos expuestos al extracto fueron similares a aquellos observados en los cultivos controles. Al contrario, en los cultivos celulares M2a y M2c expuestos a las IL-4 e IL-10 no hubo producción TNF- α ($p < 0.001$).

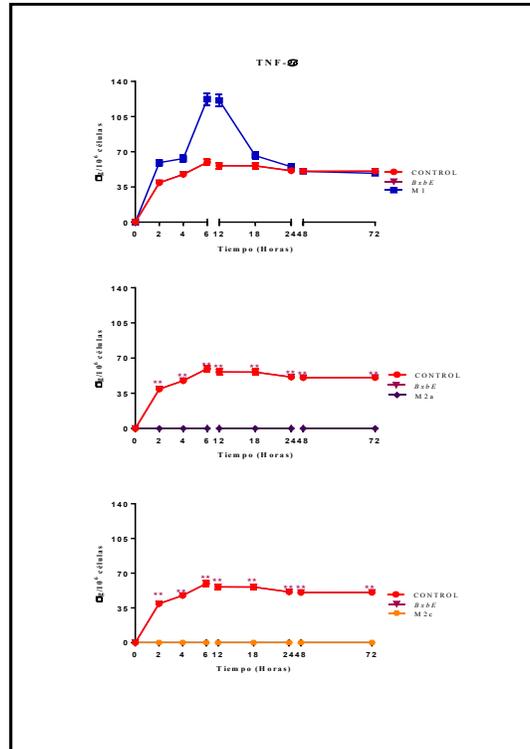


Figura 17: Producción de TNF- α en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos, mantenidos y tratados como se describió en materiales y métodos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación de los niveles de TNF- α como anteriormente se describió. Cada punto representa los niveles de medios de \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.01^*$; $p < 0.001^{**}$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 %.

Producción de IFN- γ . En la Figura 18 se describen los niveles de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos expuestos a los distintos tratamientos. Los niveles de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de los macrófagos M1 expuestos al LPS comienzan a aparecer desde las 2 horas de exposición y alcanzan la máxima producción a las 72 horas de exposición. La producción de IFN- γ obtenida en los cultivos de macrófagos M1 expuestos al LPS fue significativamente mayor cuando comparada a aquellos niveles obtenidos a partir de los cultivos expuestos al extracto de *Bougainvillea xbuttiana*. La producción de IFN- γ en los cultivos de macrófagos expuestos al *BxbE* y macrófagos M2a y M2c expuestos a las IL-4 e IL-10 fue similar, además fue significativamente menor cuando comparada a la producción de IFN- γ obtenida en los cultivos controles.

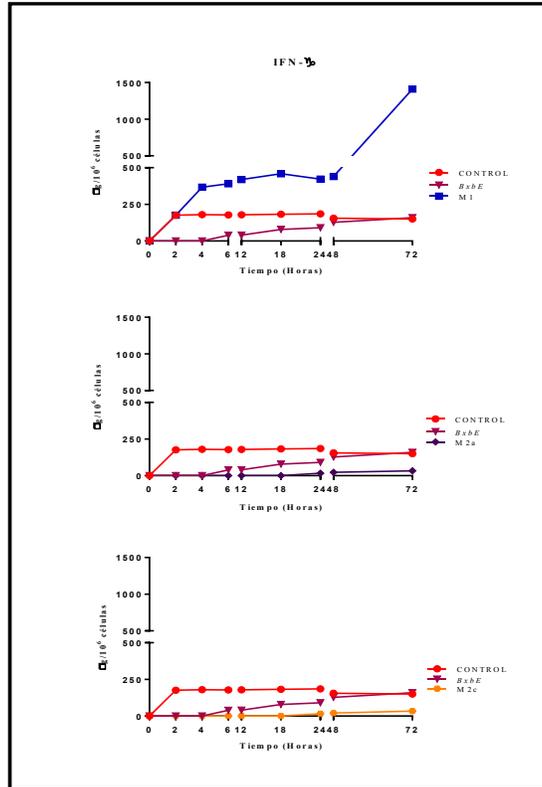


Figura 18: Producción de IFN- γ en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas 10 y 4. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos, mantenidos y tratados como se describió en materiales y métodos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación de los niveles de IFN- γ como anteriormente se describió. Cada punto representa los niveles de medios de \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.001^*$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de IL-1 β . En la Figura 19 se puede observar que la producción de IL-1 β en los distintos tratamientos comienza a aparecer desde las 2 horas. En los cultivos de macrófagos M1 expuestos al LPS los mayores niveles de IL-1 β fueron observados a las 12 horas de exposición, decayendo posteriormente. La producción de IL-1 β en los cultivos de macrófagos M1 fue significativamente mayor cuando comparada con aquella observada en los cultivos expuestos al extracto ($p < 0.001$). Las mayores producciones de IL-1 β en los cultivos expuestos al extracto y en los cultivos de macrófagos M2a y M2c fueron obtenidas a las 12 horas de exposición. Para estos tres tipos de tratamientos los niveles de IL-1 β fueron similares (Fig. 19).

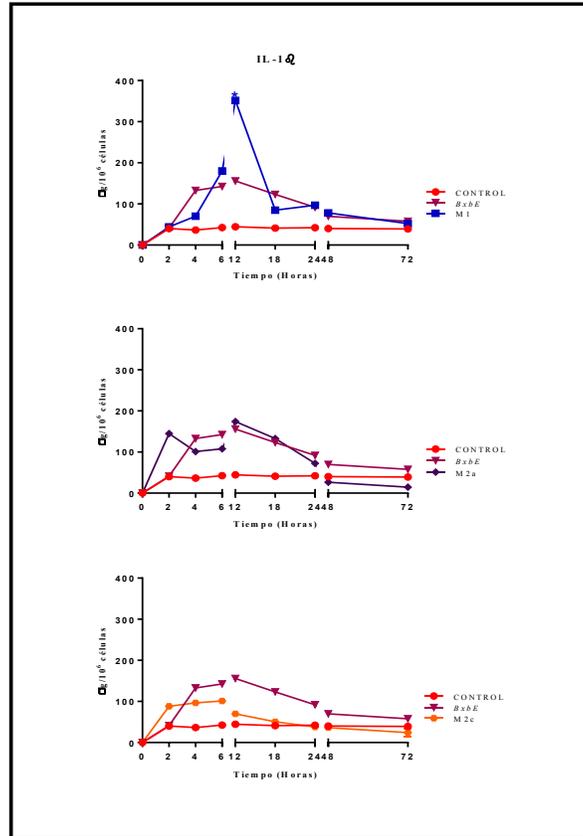


Figura 19: Producción de IL-1 β en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavado peritoneales y expuestos a diferentes tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de IL-1 β como se describió en materiales y métodos. Cada punto representa los niveles medios de \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.001$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de IL-4. En la Figura 20 se observa que en todos los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales expuestos a los diferentes tratamientos los niveles de IL-4 comienzan a aparecer desde las 2 horas de exposición. La mayor producción de IL-4 en los cultivos de macrófagos M1 expuestos al LPS fue a las 12 horas del tratamiento. Los niveles de IL-4 obtenidos en los cultivos de macrófagos M1 fueron significativamente mayores cuando comparados a aquellos niveles obtenidos en los macrófagos expuestos al extracto ($p < 0.001$). Los mayores niveles de IL-4 en los cultivos de macrófagos M2a y M2c expuestos a las IL-4 e IL-10 fueron observados a las 2 horas del tratamiento. La producción de IL-4 en los cultivos de macrófagos expuestos al extracto fue significativamente menor cuando

comparada a aquella producción obtenida en los cultivos expuestos a las interleucinas ($p < 0.001$).

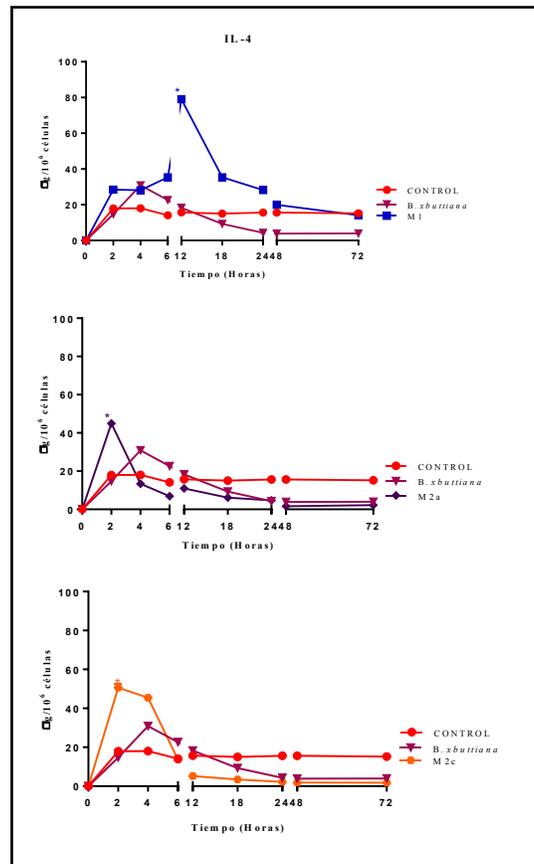


Figura 20: Producción de IL-4 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavados peritoneales y expuestos a distintos tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de IL-4 como se describió en materiales y métodos. Cada punto representa los niveles medios de \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes. ($p < 0.001^*$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de IL-5. En la Figura 21 se encuentran descritos los niveles de IL-5 presente en los sobrenadantes de los macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos. La mayor producción de IL-5 en los macrófagos M1 expuestos al LPS fue observada a las 4 horas del tratamiento. Los niveles de IL-5 presentes en los cultivos de macrófagos M1 fueron significativamente mayores cuando comparados a aquellos obtenidos en los cultivos

expuestos al extracto de *BxbE* ($p < 0.001$). Al contrario, en los cultivos de macrófagos M2a y M2c expuestos a las interleucinas y/o al extracto los mayores niveles de IL-5 fueron observados a las 2 horas de exposición, decayendo posteriormente. La Figura 21 también muestra que, la producción de IL-5 fue similar en los cultivos de macrófagos expuestos al extracto y a las interleucinas.

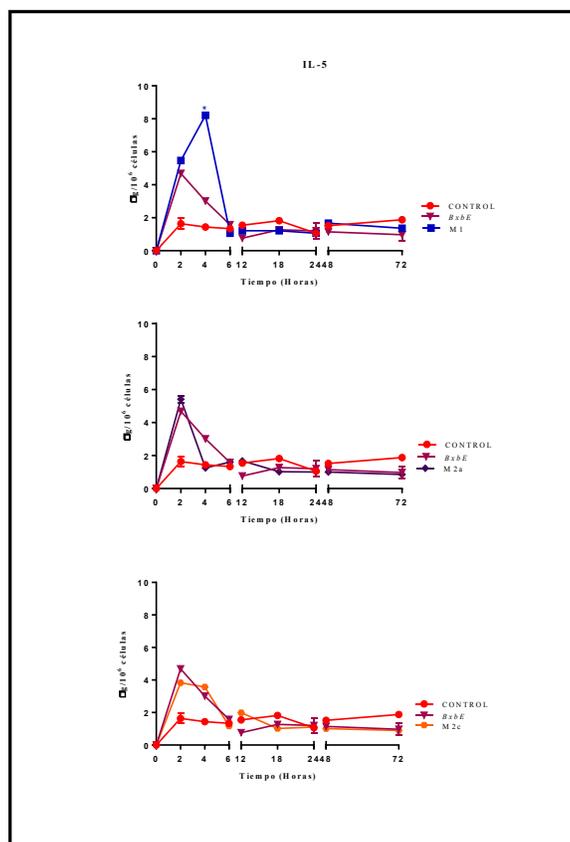


Figura 21: Producción de IL-5 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavados peritoneales y expuestos a distintos tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de IL-5 como anteriormente se describió. Cada punto representa los niveles medios de \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.01^*$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de IL-6. La Figura 22 muestra que los niveles de IL-6 presentes en los sobrenadantes de los macrófagos expuestos a distintos tratamientos comienzan a aparecer a las 2 horas del tratamiento. Los mayores niveles de IL-6 presentes en los cultivos de macrófagos M1 expuestos al LPS fueron observados a las 18 y 24 horas, decayendo

posteriormente. La producción de IL-6 en los cultivos de macrófagos M1 fue significativamente mayor cuando comparada a aquella obtenida en los cultivos tratados con el extracto ($p < 0.001$). Niveles similares de IL-6 fueron obtenidos a partir de los cultivos de macrófagos expuestos al extracto y/o a los macrófagos M2a y M2c.

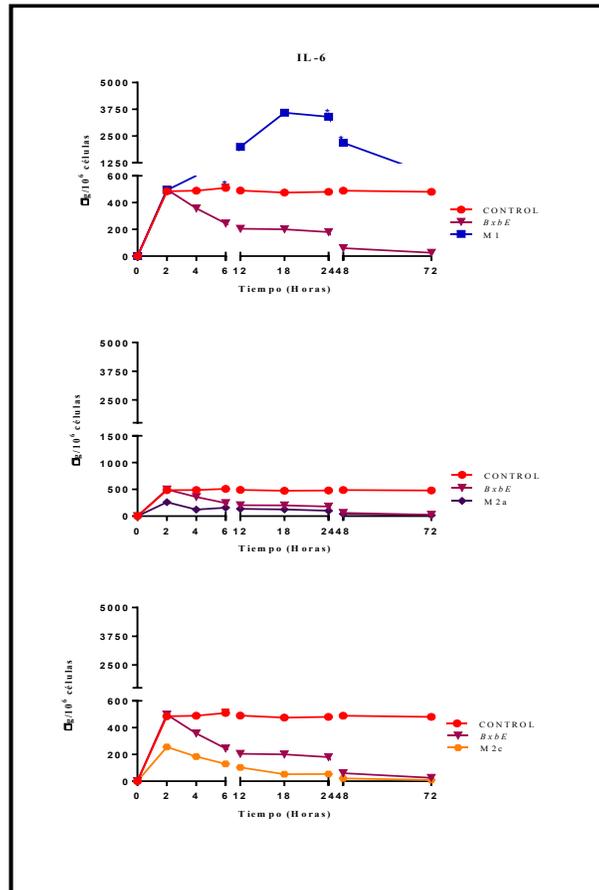


Figura 22: Producción de IL-6 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavado peritoneales y expuestos a diferentes tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de IL-6 como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa los niveles medios de \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.001^*$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de IL-10. La Figura 23 muestra los niveles de IL-10 presentes en los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales expuestos a los diferentes tratamientos. Los niveles de IL-10 presentes en los sobrenadantes de los macrófagos M1 expuestos al LPS fueron significativamente menores cuando comparados a aquellos niveles obtenidos en los cultivos expuestos al extracto y/o a las interleucinas ($p < 0.001$). La producción de IL-10 en

los cultivos expuestos al *BxbE* y de macrófagos M2a y M2c expuestos a las interleucinas iniciaron a las 2 horas y alcanzan un máximo a las 72 horas del tratamiento. La producción de IL-10 en los cultivos de macrófagos M2c expuestos a la IL-10 fue significativamente mayor cuando comparada a aquella obtenida en los cultivos tratados con el extracto ($p < 0.001$). Niveles similares de IL-10 fueron observados en los cultivos de macrófagos expuestos al *BxbE* y macrófagos M2a.

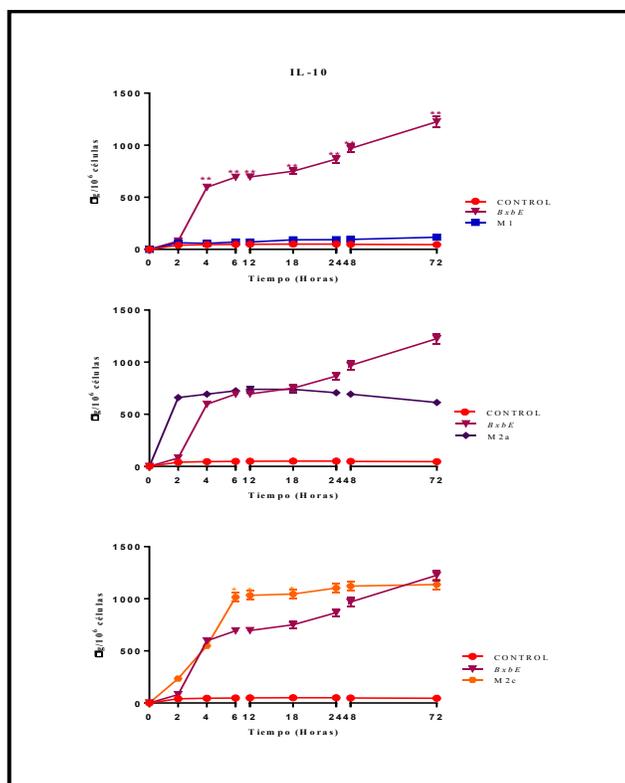


Figura 23: Producción de IL-10 en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavado peritoneales y expuestos a diferentes tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de IL-10 como anteriormente se describió. Cada punto representa los niveles medios de \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.001^{**}$; $p < 0.01^*$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de TGF- β . Los niveles de TGF- β presentes en los cultivos de macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos se encuentran descritos en la Figura 24. En los sobrenadantes de los macrófagos M1 expuestos a LPS no se observaron la producción de TGF- β . Al contrario, los niveles de TGF- β presentes en los cultivos celulares expuestos al

extracto fueron observados en dos picos uno a las 6 horas y otro a las 48 horas del tratamiento. Las mayores producciones de TGF- β observada en los cultivos de macrófagos M2a y M2c expuestos a las IL-4 e IL-10 fueron observadas a las 4 y 48 horas de exposición, respectivamente. Los niveles de TGF- β obtenidos en los cultivos de macrófagos expuestos al extracto fueron similares a aquellos niveles obtenidos en los cultivos de macrófagos M2a. La producción de TGF- β en cultivos de macrófagos M2c fue significativamente menor cuando comparados a aquellos observados en los grupos de cultivos de macrófagos expuestos al *BxbE* ($p < 0.01$).

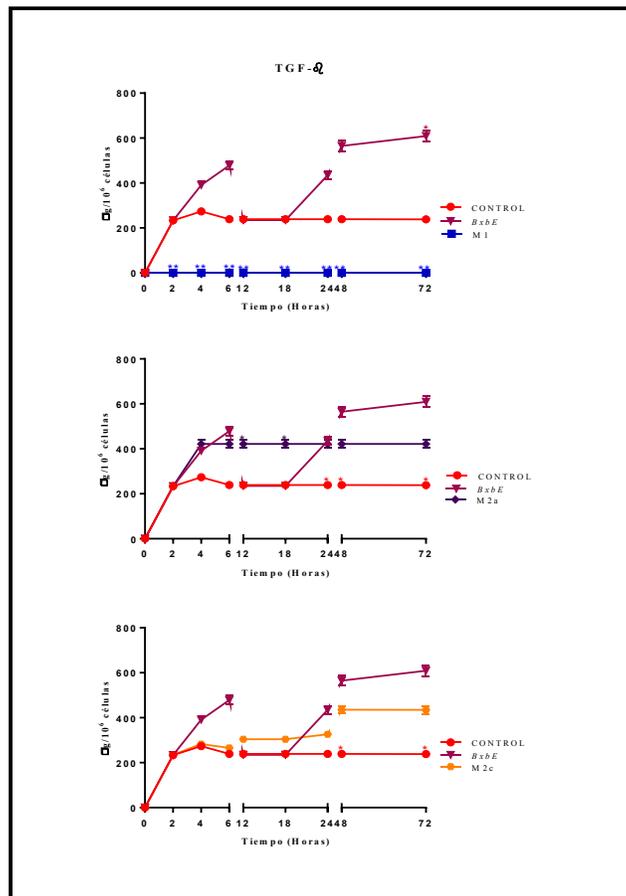


Figura 24: Producción de TGF- β en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *BxbE*, LPS e Interleucinas. Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos a través de lavados peritoneales y expuestos a diferentes tratamientos. En diferentes intervalos de tiempo los sobrenadantes se colectaron para la determinación de los niveles de TGF- β como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa los niveles medios de \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos diferentes ($p < 0.001^{**}$; $p < 0.01^{*}$). En todos los experimentos las desviaciones estándar fueron menor del 5 % y por lo tanto no se observan.

Producción de óxido nítrico. En la Figura 25 se encuentran descritos los niveles de NO presentes en los cultivos de los macrófagos expuestos a los diferentes tratamientos. La producción de NO comenzó a aparecer a las 2 horas de tratamiento. En los sobrenadantes de los macrófagos expuestos al *BxbE* los mayores niveles de NO se observaron a las 18 horas y fueron significativamente mayores cuando comparamos con los niveles de NO presentes en los macrófagos M1 expuestos al LPS y M2a y M2c expuestos a las interleucinas ($p < 0.01$ e $p < 0.02$, respectivamente).

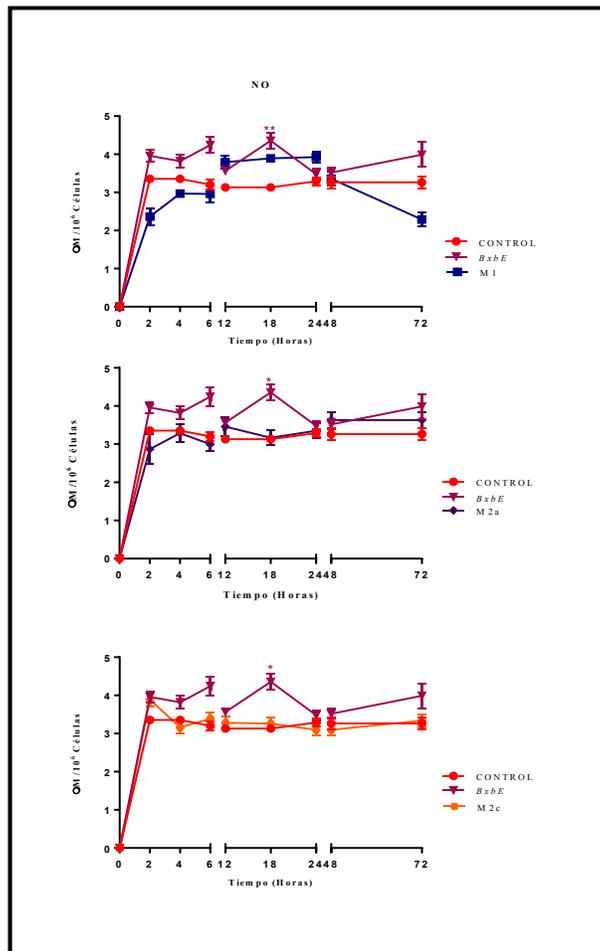


Figura 25: Producción de NO en macrófagos peritoneales expuestos al extracto *BxbE*, LPS e Interleucinas: Los macrófagos fueron obtenidos y sometidos a diferentes tratamientos. Los niveles de NO fueron determinados a través del ensayo colorimétrico de Griess. Cada punto representa los valores medios \pm las desviaciones estándar de 6 experimentos diferentes ($p < 0.02^*$; $p < 0.01^{**}$).

Análisis de la vía de activación del extracto de *Bougainvillea xbutiana*.

La Tabla 8 se hace una comparación cualitativa de los mediadores secretados por los macrófagos tratados con el extracto de *B. xbutiana*, con los macrófagos M1 estimulados con LPS y M2a y M2c estimulados las interleucinas 4 y 10. En donde el símbolo de palomitas significa la secreción de las citocinas y el óxido nítrico y la X representa la escasa o nula producción. El extracto de *Bougainvillea xbutiana* presentó una similitud de 77.77 % y 33.33 % con los macrófagos M2a y M2b, respectivamente. Los macrófagos M2b se caracterizan por un fenotipo muy diferente a los M2a y M2c. Al contrario, la estimulación con el extracto fue 100 % similar a los macrófagos M2c estimulados con IL-10.

Tabla 8: Análisis cualitativa de los mediadores segregados por macrófagos estimulados.

ESTIMULACIÓN	TNF- α	IFN- γ	IL- β	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	TGF- β	NO
Vía clásica									
M1 estimulados con LPS.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X
Vía alternativa									
M2a	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
M2b	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	X
M2c	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
Vía de activación de interes:									
Extracto de <i>B. xbutiana</i>	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓

7. DISCUSIÓN

En la búsqueda de nuevas sustancias farmacológicamente activas dentro del reino vegetal existen diversos criterios para elegir el material a estudiar. Uno de ellos es la etnobotánica, donde se escogen plantas utilizadas ancestralmente por culturas locales para combatir diferentes malestares. Con algunas matizaciones, este tipo de búsqueda coincide con nuestra forma de selección de la materia prima, para el desarrollo en la utilización de recursos naturales, que no sólo incluye el uso directo medicinal, sino también la extracción de los principios activos, su elucidación estructural, y el modelado de nuevas moléculas a partir de ellos, que presenten un mayor efecto terapéutico y menor toxicidad³.

En la actualidad se buscan nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora a partir de extractos vegetales que estimulen el sistema inmune como una alternativa para la medicina tradicional⁷⁷. Esta búsqueda está relacionada en la obtención de nuevos compuestos los cuáles presenten menores efectos adversos y de menor precio.

En la medicina tradicional antigua, el término inmunoestimulante era desconocido. En algunos casos, las especies de plantas medicinales que "purifican la sangre", "fortalecen el cuerpo," e "incrementan las defensas del organismo" se han utilizado como agentes inmunoestimulantes⁷⁸.

El uso tradicional del género *Bougainvillea* es para tratar enfermedades que involucran procesos inflamatorios como enfermedades respiratorias principalmente como se mencionó anteriormente, además a este mismo género se le atribuye actividades farmacológicas comprobadas como: analgésica, antidiabética, antiinflamatoria entre otras. También se mencionó anteriormente un artículo publicado por Arteaga y col., en el 2015³⁶ que demuestra que el extracto de *B. xbutiana* tiene un efecto inmunomodulador sobre macrófagos peritoneales de ratones de la cepa CD-1. El extracto de *BxbE* interviene en el estatus funcional de los macrófagos peritoneales aumentando la formación de vacuolas, incrementando los niveles de peróxido de hidrógeno e intensificando la expansión celular como la fagocitosis. Recientemente, otro artículo publicado por Ghonime y col. 2015⁷⁸ mencionaron que el extracto de *B. glabra* posee un efecto inmunomodulador sobre

macrófagos RAW 264 ya que incrementa significativamente la función fagocítica de estos macrófagos, baja significativamente los niveles de NO cuando estos macrófagos fueron expuestos previamente con LPS, también disminuye significativamente los niveles de la citocina TNF- α .

En este trabajo se determinó el estado funcional de los macrófagos en cultivo expuestos al extracto de *B. xbutiana*, a LPS y a las interleucinas 4 y 10 a través de los ensayos: vacuolización y producción de peróxido de hidrógeno.

Este estudio mostró que *BxbE* fue capaz de ocasionar alteraciones morfológicas en los macrófagos, y de potencializar la formación de vacuolas. En los resultados de los macrófagos tratados con LPS e interleucinas 4 y 10 los niveles de vacuolización fueron más elevados que aquellos obtenidos por macrófagos expuestos al extracto. Estos resultados sugieren que el extracto presento una leve acción citotóxica sobre los macrófagos.

Varios autores han descrito que el incremento del número de vacuolas durante la estimulación está relacionado con el aumento de la exocitosis de proteínas inflamatorias. Las partículas ingeridas por las células fagocíticas vía mecanismos de receptor involucran un grande desajuste del citoesqueleto⁸⁰. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que los macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *B. xbutiana* forman vacuolas al igual que aquellos tratados LPS y a las interleucinas 10 y 4. Estos resultados son similares a los obtenidos por Arteaga y col., en 2015³⁶ los cuales se observó la capacidad del extracto de *B. xbutiana* de inducir la formación de vacuolas en los macrófagos peritoneales de la cepa CD-1.

En acuerdo a las condiciones experimentales usadas en este estudio, se demostró que el extracto fue capaz también de inducir la producción de peróxido de hidrógeno en los cultivos de macrófagos. La difusión del peróxido de hidrógeno es un mecanismo importante en la interacción entre el fagocito y la partícula a ser ingerida, cualquier sustancia que inhibe la propagación de los macrófagos, también interfiere con el proceso de fagocitosis. Una vez que la célula fagocitaria es activada incluye varios cambios, aumenta su tamaño, sus organelos intracelulares aumentan en número y complejidad y adquiere mayor capacidad fagocítica, que produce concentraciones más altas de enzimas hidrolíticas,

y comienza a secretar una diversidad de factores solubles y se dispersa la totalidad del cuerpo⁸⁰. La fusión del lisosoma primario a la vesícula de endocitosis forma un heterofagosoma y se produce un aumento transitorio del pH, el cual es seguido por una acidificación capaz de destruir muchos microorganismos, esta actividad microbicida dependiente del oxígeno puede ser: independiente de la mieloperoxidasa, proteína de la membrana del fagosoma que cede electrones al oxígeno molecular y produce aniones superóxido e hidroxilo, que van a poder generar peróxido de hidrógeno con acción bactericida⁷⁷. Estos resultados sugieren que el extracto tuvo un efecto directo en las variaciones de los niveles de peróxido de hidrógeno a las 24 horas ($p < 0.05$ y $p < 0.01$).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el extracto de *B. xbutiana* fue capaz de modificar los porcentajes de fagocitosis y expansión celular. Los macrófagos al ser activados o estimulados son capaces de expandirse y adherirse al endotelio, extravasarse atravesando la membrana basal, migrando hacia la zona extravascular, así como tener la capacidad de ingerir y digerir antígenos exógenos, como microorganismos completos, partículas insolubles, y material endógeno como células hospedadoras lesionadas o muertas, desechos celulares y factores de la coagulación activados. Además, la realización de ensayos de expansión celular permite observar la capacidad de adherencia a algunos sustratos como vidrio o plástico que están vinculados al desarrollo de reacciones inflamatorias y fagocitosis, así como permitir diferenciar poblaciones macrofágicas con distinto comportamiento migratorio, de diferenciación y muerte celular⁷⁷. Los resultados obtenidos en trabajo indican que el LPS y el *BxbE* fueron capaces de inducir elevados porcentajes altos de expansión celular y fagocitosis ($p < 0.02$; $p < 0.01$).

El presente trabajo fue diseñado para conocer la vía de activación de los macrófagos peritoneales, cuando se expusieron al extracto de *B. xbutiana* y comparar esta vía de activación con la de aquellos macrófagos que fueron expuestos a LPS y las interleucinas 4 y 10. Para establecer las condiciones óptimas de la interacción del extracto de *B. xbutiana* con los macrófagos, se evaluó la citotoxicidad en los cultivos celulares. En este estudio se observó que la citotoxicidad en macrófagos peritoneales expuestos al extracto de *B. xbutiana* no ejerce un efecto negativo sobre estas células fagocíticas, como anteriormente

fue demostrado Arteaga y col. en 2015³⁶. Estos resultados están de acuerdo con los autores que demostraron el bajo efecto citotóxico de IL-10 en cultivos de macrófagos⁸¹.

Los macrófagos son una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune. Ellos son efectores de la respuesta innata y están involucrados en el inicio y la regulación de las respuestas adaptativas. Los macrófagos activados clásicamente (M1) inducidos por LPS, IFN- γ y/o TNF- α muestran un fenotipo tipo Th1, son efectores proinflamatorios y tienen funciones bactericidas, mientras que los macrófagos activados alternativamente (M2), que incluye por lo menos tres fenotipos diferentes solapados (M2a, b, c), exhiben un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la curación del tejido. El fenotipo M2a se induce principalmente por citocinas como 4 y 13, estos macrófagos regulan los diferentes componentes del sistema IL-1, lo cual permite contrarrestar sus acciones proinflamatorias. Las interleucinas 4 y 13 estimulan la expresión Arg1 *in vitro*, extinguiendo el sustrato de NOS e inhibiendo la liberación de NO e IL-10. Para los macrófagos M2b se pueden inducir por la exposición a complejos inmunes, agonistas de CD64 opsonizados con IgG como eritrocitos, se caracterizan por un fenotipo muy diferente a los M2a y M2c, pues tienen alta expresión de IL-10 y baja de IL-12, producen altos niveles citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 y no expresan Arg1, y regulan positivamente por CD86. Mientras que, los macrófagos M2c son inducidos por IL-10 y glucocorticoides; IL-10 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, la liberación del NO y ROIS y las actividades antimicrobiales de los macrófagos. Profundizando acerca de los mecanismos que definen estos fenotipos, será posible entender mejor la influencia y el papel de los macrófagos activados alternativamente en las respuestas inmunes reguladas por ellos y en la patogénesis de diferentes enfermedades asociadas con el desarrollo de este grupo de macrófagos⁸².

Los macrófagos pueden ser activados por varios mecanismos, cuando estas células son activadas generan la formación de vacuolas que tienen una cantidad mayor de lisosomas y liberan radicales libres y citocinas, aumentando su actividad metabólica y microbicida⁷⁷. Además, los macrófagos pueden presentar diferentes morfologías y funciones.

Una gran parte de las moléculas presentes en las superficies de los patógenos son capaces de inducir en los macrófagos una activación conocida como “activación clásica”. El mejor ejemplo de ello lo encontramos con el LPS, molécula presente en la pared de las bacterias Gram negativas, que induce la liberación de varias citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-1, principalmente⁵³. En este trabajo de investigación los niveles de TNF- α , obtenidos por los macrófagos expuestos al LPS aumentan considerablemente a las 6 y 12 horas de exposición, los resultados obtenidos por Hernández y col., en 2014⁸³, fueron similares a aquellos macrófagos peritoneales de ratones de la cepa ICR expuestos a 5 ng/ml de LPS, incrementaron los niveles de TNF- α y cuando estos macrófagos son expuestos a esta misma cantidad de LPS y una fracción del extracto con actividad antiinflamatoria y antiviral de *Satureja boloviana*, los niveles de esta citocina proinflamatoria disminuyen significativamente ($p < 0.01$). Lo cual sugiere que el extracto de *B. xbutiana* tiene un efecto similar a aquellos observados a los cultivos de macrófagos tratados con extracto de *S. boloviana*, ya que disminuyen la actividad proinflamatoria al ser confrontados con el LPS, ya que reduce significativamente los niveles de TNF- α ($p < 0.005$). Mientras que los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 no hay presencia de la producción de esta citocina, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Voguel y col., en 2014⁸⁷, en donde macrófagos derivados de monocitos humano al ser estimulados con IL-10 e IL-4 no producen la liberación de TNF- α . Otra citocina inflamatoria que fue cuantificada en este proyecto es IFN- γ , los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican que los macrófagos activados con las diferentes concentraciones de LPS en un periodo de exposición por 72 horas son significativamente altos que cuando se compararon con niveles de IFN- γ presentes en los macrófagos expuestos al extracto de *B. xbutiana*, así como, por los expuestos a las interleucinas 10 y 4 y los grupos controles ($p < 0.001$). Correa y Rojas en el 2007⁸² mencionaron que los macrófagos activados alternativamente con interleucinas 10 y 4 son capaces de bloquear la liberación de IFN- γ . Estos resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo ya que los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 no hay presencia IFN- γ . Martínez y Gordon en 2014⁴⁷ mencionan que los macrófagos activados clásicamente principalmente con LPS inducen a la activación de genes que promueven la liberación de IFN- γ , además se menciona que esta citocina proinflamatoria está involucrada en la defensa contra infecciones por protozoarios principalmente, por otra

parte, los macrófagos tratados con el extracto de *B. xbutiana* presentan bajos niveles de IFN- γ , resultados similares a los obtenidos por Arteaga y col, en el 2014³⁶. Para los resultados de la IL-1 β liberada por macrófagos activados clásicamente son altos, a las 12 horas de exposición. Mientras, que los niveles de IL-1 β presentes en los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 son similares a los presentes en los cultivos celulares expuestos a *BxbE* y el grupo control, ya que Correa y Rojas en el 2007⁸² mencionan que tanto IL-10 e IL-4 regulan negativamente a IL-1 β induciendo bajos o nulos niveles de esta citocina.

Los resultados de los niveles de la interleucina 4 obtenidos en los macrófagos peritoneales tratados como anteriormente descritos, se observa claramente que los mayores niveles de interleucina 4 se presentan en aquellos macrófagos expuestos al LPS, en un periodo de exposición de 12 horas, los cuales son significativamente más altos que en aquellos macrófagos expuestos al *BxbE*. Estos resultados podrían tratar de explicarse con lo publicado por Gordon y Martínez en el 2010⁴⁷, en donde hacen referencia, que la IL-4 se produce en macrófagos activados. En estudios realizados con macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, activados con LPS pueden producir niveles de IL-4, donde se observó que esta interleucina tiene la habilidad de suprimir a citocinas proinflamatorias como: TNF- α . Resultados similares se obtuvieron con la producción de la IL-5, en donde los macrófagos activados con LPS producen niveles altos de esta interleucina a las 4 horas³.

La interleucina 6 es una citocina que está involucrada en procesos inflamatorios, debido a que su secreción es inducida por un gran número de estímulos como LPS, TNF- α e IL-1 β ⁸⁵. Sin embargo, puede tener un efecto dual, ya que la respuesta proinflamatoria inicial está controlada por moléculas inmunorreguladoras como los inhibidores específicos y los receptores solubles de las citocinas. Las principales citocinas antiinflamatorias son el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 ra), el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) y las interleucinas 4, 6, 10, 11 y 13⁸⁶. Algo similar en lo que sucede con los macrófagos expuestos al LPS. Así, los niveles de IL-6 presentes en los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 son bajos en las primeras 24 horas y al aumentar el tiempo de exposición los niveles de IL-6 tienden a desaparecer. Resultados similares fueron obtenidos Voguel y col., en el 2014⁸⁴, en donde macrófagos derivados de mocitos

activados con estas interleucinas liberan bajos niveles de IL-6 a las 48 horas. Un efecto similar se obtuvo en los macrófagos expuestos a *BxbE* ya que los niveles de IL-6 fueron parecidos a los secretados por los macrófagos expuestos a las interleucinas. La IL-10 es la citocina antiinflamatoria más importante en la respuesta inmune. Es un potente inhibidor de las citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, G-CSF, MIP-1 α , MIP-2 α , RANTES, e incluso, de sí misma. Además, degrada el ARN mensajero encargado de la síntesis de estas citocinas. Atenúa la expresión celular del receptor para el TNF- α y promueve la siembra de estos receptores a la circulación sistémica. La IL-10 se produce de manera proporcional a la intensidad del estímulo inflamatorio. Todos los trabajos apuntan a que TNF- α es el principal estímulo para su secreción Sánchez y col, 2005 demostraron que los niveles altos de esta interleucina en macrófagos expuestos a diferentes concentraciones de LPS inicia la activación clásica, incrementa los niveles de citocinas proinflamatorias en las primeras horas de exposición y disminuyen en tiempos posteriores debido a la aparición de citocinas antiinflamatorias como es el caso de la IL-10. Además, la IL-10 puede ser secretada de forma autocrina o ante estímulos de citocinas antiinflamatorias⁸⁷. Estos resultados pueden ser explicados por los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 y *BxbE* ya que producen niveles de IL-10 ($p < 0.01$, $p < 0.001$). El TGF- β es un mediador de tipo antiinflamatorio, estando involucrado en diferentes fisiopatologías, esta citocina TGF- β junto con IL-10 e IL-4 inducen a la microglía hacia estadio de tipo M2 o alternativo⁸⁸. Así que, se podría explicar que los niveles de TGF- β presentes en los macrófagos expuestos a las interleucinas 10 y 4 y a los expuestos al *BxbE* ya que son significativos ($p < 0.001$). Además, los macrófagos expuestos al LPS inducen la baja producción de TGF- β ($p < 0.001$)⁸⁸.

El óxido nítrico es un mediador relacionado directamente con la activación de macrófagos y actúa como modular del sistema inmune. Además, en grandes cantidades, puede inhibir la producción de citocinas, pero en pequeñas cantidades pueden inducir las. El NO producido por los macrófagos puede inhibir la proliferación de linfocitos T producidos durante la respuesta inmune celular⁸⁹. Además, el NO rige la adhesión de polimorfonucleares y contribuye en el mantenimiento de la integridad de la barrera microvascular, a la vez que disminuye la permeabilidad vascular, la inflamación y la formación de edema⁹⁰. En este trabajo se demostró que los macrófagos expuestos al extracto de *B. xbutiana* producen

altos niveles de NO, resultados similares a los obtenidos por Arteaga y col., en 2015³⁶, donde macrófagos peritoneales de la cepa de ratones CD1 presentan niveles altos de NO al ser expuestos con 290 μ L del mismo extracto.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad muestran que el extracto de *B. xbutiana* no tiene efecto negativo sobre los macrófagos peritoneales, además, la formación de vacuolas, producción de peróxido de hidrógeno presentes en los macrófagos expuestos al extracto, el incremento en el porcentaje de expansión celular, así como la fagocitosis sugieren que si están activados. Por otra parte, los macrófagos activados clásicamente (LPS) liberan grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) y a tiempos tardíos citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10), así como moderados niveles de NO, para tratar de mantener la homeostasis de dichas células. En cambio, la activación alternativa o M2 que se clasifica en tres M2a, M2b y M2c. La vía de activación M2a se caracteriza principalmente por la activación ante estímulos de las interleucinas 4 y 13, las cuales generan que los macrófagos generen citocinas antiinflamatorias como: IL-10, IL-1ra e IL-12 principalmente, así como la producción de Arginina; mientras que la vía M2c las cual activa a los macrófagos por medio de interleucina 10 y glucocorticoides, provocan que los macrófagos liberen citocinas como: IL-10 y TGF- β , principalmente y en algunas ocasiones pueden liberar NO. Los macrófagos M2b se caracterizan por un fenotipo muy diferente a los M2a y M2c, pues tienen alta expresión de IL-10 y baja de IL-12, producen niveles de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF-, IL-1 β e IL-6 no expresan Arg1. Estudios en murinos para la caracterización de esta población de macrófagos han mostrado que existe mayor similitud entre los M2a y M2c, aunque los patrones de producción de citocinas (IL-12 e IL-10) entre estas dos poblaciones difieren⁸⁴.

Por lo tanto, el extracto de *B. xbutiana* afecto el estatus funcional de los macrófagos peritoneales de ratones hembra de la cepa BALB/c por lo que:

- Aumentó la formación de vacuolas.
- Incrementó los niveles de peróxido de hidrógeno.
- Intensifico la fagocitosis.
- Elevó la expansión celular.

Además, el extracto de *B. xbutiana* tuvo efecto en la producción de mediadores inflamatorios como:

- Disminuyó los niveles de IFN- γ y TNF- α .

- Incrementó los niveles de IL-10, TGF- β y NO.

Los resultados obtenidos sugieren que el extracto de *B. xbutiana* activa macrófagos hacia una predominante vía alternativa M2c.

9. REFERENCIAS

1. Lozoya, X., Velásquez, G. (1988). Medicina Tradicional de México: La Experiencia del Programa IMSS-Coplamar. México. Instituto Mexicano del Seguro Social.
2. Grupo de Especialistas de Plantas Medicinales (MPSG). 2006. Estándar Internacional para la Recolección Silvestre Sostenible de Plantas Medicinales y Aromáticas -SSC-MAP. Borrador de Trabajo (Junio 2006). Grupo Directivo para el Desarrollo de un Estándar Internacional para la Recolección Silvestre Sostenible de Plantas Medicinales y Aromáticas.
3. Esquivel-Gutiérrez E, Noriega-Cisneros, R, Bello-González M, Saavedra- Molina A, Salgado, A., Garcia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Michoacán, México. (1): 45-52.
4. Lifchitz, A. (2012). PLANTAS MEDICINALES Guía Práctica de Botánica Universal. Buenos Aires. Kier. 256.
5. Torres, L., Tapia Ma. E. y Aguilar A. (2005). Plantas Medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Universidad de Barcelona. España. Publicaciones Ediciones de la Universidad de Barcelona. 84-475.
6. Olaya, J. y Méndez J. (2005). GUÍA DE PLANTAS Y PRODUCTOS MEDICINALES. Bogota.CAB. 1-37.
7. Álvarez G. R. (2012). Plantas medicinales en una aldea de Tabasco México. Revista Fitotécnica de México. (35):43-49.
8. Bradley. R. (2007). Algorithm for complementary and alternative medicine practice and research in type 2 diabetes. Revista Complementaria Medica. (13): 75-159.
9. Mang, B., Wolters, M., Schmitt, B., Kelb, K., Lichtinghagen, R., Stichtenoth, D.O., Hahn, A. (2006). Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. European Journal of Clinical Investigation. (3):340-344.
10. Larson. R. (1997). Naturally occurring antioxidants. Lewis Publishers, Boca Raton.
11. Castañeda, C., Ramos, LL., Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Siete Plantas Peruanas. Revista Horizonte Medico. (8): 56-74.
12. Montané, J., Ortega, T., García, M.M. (1995). Iron metabolism and oxidative stresses during acute and chronic phases of experimental inflammation. Effect of iron-dextran and deferoxamine. Journal of Laboratory and Clinical Medicine (126): 43-435.
13. Amarakoon, A.M., Tappia, P.S., Grimble, R.F. (1995). Endotoxin induced production of interleukin-6 is enhanced by vitamin E deficiency and reduced by black tea extract. Journal of Inflammation. (44): 301-5.

14. Álvarez, A.L., Barbosa, L., Patiño, V., Petricevich, V. (2012). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Bougainvillea xbutiana*. *Revista de Etnofarmacología*. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. (44): 709-12.
15. Arteaga, L., Barbosa, L., Patiño, V., Petricevich, V. (2014). "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents, and cytotoxicity evaluation of *Bougainvillea xbutiana*," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1:9.
16. Pérez, J., Qutián, L., Escalante, H. (2009). Tesis Doctoral: EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS DE LOS RESIDUOS DEL BENEFICIO DEL FIQUE. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingeniería Química. Bucaramanga. (73): 85-91
17. Muñoz, E., Rivas, K., Flavia, M.G., Mendoza, S., Reinos, S., Ramos, M. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. (3): 481-495.
18. Gómez, H.A., Gonzales, K.N., Medina, J.D. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. (10):182-217.
19. Avalos, A., Pérez, E. (2009). Metabolismo Secundario de las Plantas. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. (2): 119-145.
20. Sánchez de Membiela, M.T. (2005). Fitoterapia para el tratamiento de la insuficiencia venenosa crónica. El castaño de indias. *Revista Internacional Científica*. Podología. (6): 31-3
21. Arroyo, J., Almora, Y., Quino, M., Ruez, E., Martínez, J., Buendía, J., Baca, D., Hañari, R. (2012). Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 16-23.
22. Manzano, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., Garcia, G., Orellana, T., Orellana, A. (2011). Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). Facultad de Ciencias. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL). Guayaquil, Ecuador. (16): 13-23.
23. Moore, R. (1998). Pinitol (3-O-Methyl-1,2,4 cis-3,5,6 trans hexahydroxy hexanol). Basis for Concluding New Dietary Ingredient will Reasonably be Expected to be safe. Department of Health & Human Services.
24. Malairanja, P., Gopalakrishnan, G., Narasimhan, S., Kala, K y Jessi, V. (2007). ANTIULCERA ACTIVITY OF CRUDE ALCHOLIC EXTRACTS OF *BOUGAINVILLEA SPECTABILIS* WILLD. *Indian Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2-1.
25. *Ars Pharm.* (2007). Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de bouganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

26. Malomo, S., Adebayo, Arise, R., Olorunin, F y Egwim, J. (2006). Effects of Ethanolic Extract of Bougainvillea spectabilis Leaves on Some Liver and Kidney Function Indices in Rats. (17): 3-8.
27. Sikandar K., Muhammad, K., Arif, Z., Muhammad, A y Urooj, K. (2013). Evaluation of In Vitro Thrombolytic Activity of Bougainvillea Spectabilis Leaf Extract. International Journal Pharmacy. Sciencie. (1):21-10.
28. Bhat, M., Kothiwale, S., Tirmale, A., Bhargava S., Joshi BN. (2001).Antidiabetic Properties of Azardiracta indica and Bougainvillea spectabilis: In Vivo Studies in Murine Diabetes Model. Evidencia Basada en la Medicina Alternativa Complementaria.
29. La Sociedad Americana de Nutrición y Ciencia. (2004). Pinitol Supplementation Does Not Affect Insulin-Mediated Glucose Metabolism and Muscle Insulin Receptor Content and Phosphorylation in Older Humans . Noviembre (134):2998-3003.
30. Rashid, F., Nadia S., Ali, I., Sharif, S., Un Nisa, F y Naz S. (2013). Phytochemical analysis and inhibitory activity of Ornamental Plant (*Bougainvillea spectabilis*). (2):1-5.
31. Adebayo, J., Ayoade, A., Adesokan, A., Lawrence, A., Olatunil, A., Daniel, O. y Soladoye, A. (2005). Effect of ethanolic extract of Bougainvillea spectabilis leaves on haematological and serum lipid variables in rats. Bioquímica. (1):45-50.
32. Qiming, X. (2003) Studies on Extraction and Properties of Natural Red Pigment from Bougainvillea Spectabilis Willd. JOURNAL OF CHUXIONG TEACHERS'S COLLEGE.
33. Bates, S., Jones, R., Bailey, C. (2000). Insulin like effect of Pintl. British Journal of Pharmacology. (139): 1944-1948.
34. Monroy C y Monroy R. (2006). Las plantas compañeras de siempre. Una experiencia en Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. CONABIO. Morelos, México. (5):525-555.
35. Nielsen, K y Boston, R.S. (2001). Ribosome-Inactivating Proteins: A plant perspective. Revista de fisiología de plantas. Universidad del norte de Carolina. (52):785-816.
36. Arteaga, L., Barbosa, L., Patiño, V., Petricevich, V. (2015). Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the *Bougainvillea xbutiana* Extract in a Mouse Model. Hindawi Publishing Corporation. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Morelos. Cuernavaca Morelos. 1-9.
37. Owen, J., Punt., J., Strandfor. S. A., Jones. P. (2014). Kuby Inmunología. England. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A de C. (5):166-168.
38. García, P. (2008). Inflamación. Revista de la Real Academia. Ciencias Exactas Físicas. España.
39. Lin, E., Calvano, S.E., Lowry, S.F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery (127):117-126.

40. Charles, A., Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2003). *Inmunobiología*. Segunda edición. Ed. Masson. España. 731.
41. Delgado, R.Y., Lemus, D., González, G., Garrido, G., Quintero, L., Lodeiro, B., Herrera, A.J., Núñez, I. (2001). *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®) and mangiferin isolated from the extract inhibit pro-inflammatory mediators in some *in vitro* and *in vivo* models of inflammation. Seminario Científico, Centro de Química Farmacéutica. IV Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Química, Cuba.
42. Blanco, B., García, F., de Torob, F y Galdo, F. (2005). El óxido nítrico y el cartílago articular. *Revista Española de Reumatología*. (3):126-33.
43. Petricevich, V.L. (2004). Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Current Drug Targest*. (3): 325-32.
44. Doménech, A., Gibello, A., Collado, V., Porras, R., Blanco, M. (2008). The Innate Immune System II: first response against infection. *Revista de Ciencias Veterinarias*. (2):17-30.
45. Soler, B. (2015). Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución del metabolismo del folato a la polarización de macrófagos. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid. 1-257.
46. Gordon, S., Taylor, P. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. (5):953-64.
47. Gordon, S., Martinez, F. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. (32):593-604.
48. Compton, J. (2002). Bone Marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol*. 173 (3): 387-94.
49. Watowich, S., Wu., H. (1996). "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Ann Rev Cell Dev Biol*. (12): 91-128.
50. Penna, G., Vulcano, M. (2002). Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Journal Immunology*. (12):673-6.
51. Xaus, J., Valledor, F. (2001). "Molecular Mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Inmunobiology*. (5):543-50.
52. Arpa, L. (2008). MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA ACTIVACIÓN CLÁSICA Y ALTERNATIVA DE LOS MACRÓFAGOS. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Barcelona.
53. García, L., Rojo, D.M., García, L.V., Hernández, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. (21): 6-14.
54. Hortelano, S. (2014). Inflamación y Macrófagos: amigos o enemigos. Grupo de Terapias Farmacológicas. Instituto de Investigaciones de Enfermedades Raras (IIER). Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

55. Claudio, E. Brown, S., Park, H., Wang, L y Siebenlist, U. (2010). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* (3): 958-965.
56. Lowe, J, Menendez D, Bushel P, Shatz M, Kirk E, Troester M. (2014). NF-kappa β coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Revista de Cancerología.* 74(8):2182-92.
57. Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Archille, A., Pesce, S., Liguon, M., Erba, E., Uboldi, S., Zucchetti, M., Pascualini, F., Nebuloni, M., Rooijen, N., Mortarini, R., Beltrame, L., Marchini, S., Fuso, M., Sanfilippo, R., Casali, P. 2013. Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. Department Immunology and Inflammation, IRCCS Clinical and Research Institute Humanitas, Rozzano, Milan, Italy.(23):249-262.
58. Pérez, R., Pérez, C., Zavala, M., Pérez, S. (1998). Hypoglycemic Activity of *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicacefolia* and *Parmantiera Eludis*. *Salud Pública de México.* (40): 354-358.
59. Cohn, Z., Benson, B. 1(965). The differentiation of mononuclear phagocytes: morphology, cytochemistry, and biochemistry. *Revista Médica.* (121): 153–170.
60. Reyes, S., Tamez, G., Rodríguez, P., Tamez, G., Richard, J., Weber, A. (2001). Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*. *Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México* (43): 304-14.
61. Bernard, M., Papini, E., Filippis, V., Gottardi, E., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rappuoli, R., Montecucco, C. (1995). Low activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, wich becomes acid and pepsin resistant. *Journal of Biological Chemistry.* (2):3937-940.
62. Pick, E., Mizel, D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methos.* (46): 2111–2126.
63. Arruda, M.S., Richi, V.B., Oliveira, S.M., Vilani-Moreno, F.R. (2004). Experimental murine mycobarieriosis: evaluation of the functional activity of elveolar macrophages in thalidomide-treated mice. *Revista de Biología Médica.* (37): 485-492.
64. Zebedee, S.L., Koduri, R.K., Mukherjee, J., Mukherjee, S., Lee, S., Sauser, D.F., Scharff, M.D., Casadevall, A. (1994). Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activites against *Cryptococcus neuformans*. *Antimicrobial Agents Chemothe.* (38):150-14.
65. Schumacher, J.H., O'Garra, A., Schrader, P., Van Kimmenade, A., Bond, M.W., Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1998). Characterization of 4 monoclonal antibodies to mouse interleukin-5 and development of mause and human IL-5 assay. *Journal of Immunology* (141): 1576-81.

66. Ruff, M.R., Gifford, G.E. (1980). Purification and physic-chemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *Journal of Immunology*. (125):1671-7.
67. Keller, R., Keist, R., Wechsler, A., Leist, T.P., Van der Meide, P.H. (1990). Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *International Journal of Cancer*. (4): 682–686.
68. Amador, V., Morón MC., Morejón, F., Martínez, Z., López Barreiro, M. (2006). Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L.. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. (1):1-11
69. Reyes, L. (2015). Identificación de metabolitos de *Bougainvillea glabra* choise variedad variegata y su efecto contra *Spodoptera frugiperda* j.e. smith. Instituto Politecnico. Yautepec, Morelos. México. 1-115.
70. Sanhueza C, Julio, Nieto K, Susana, & Valenzuela B., Alfonso. (2002). ACIDO LINOLEICO CONJUGADO: UN ACIDO GRASO CON ISOMERIA TRANS POTENCIALMENTE BENEFICIOSO. *Revista chilena de nutrición*, 29(2), 98-105.
71. Pérez, V. (2015). “ESTRUCTURA QUÍMICA DE ALGUNOS COMPONENTES DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL FRUTO *Bunchosia armeniaca* (CANSÁ BOCA) CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA”. FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA. LIMA, PERU. 1-82.
72. Jiménez, P., Masson, LS., Quiral RV. (2013). Composición química de semillas de chíá, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición*. 40(2):155-60.
73. García, LA., Moro, C., Manchón, N., Ruiz, GA., Villares, A., Guillamón, E., y col. (2014). In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *FoodChem*.
74. Pérez, RM., (2005). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. INP. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. México. (36): 1-7.
75. Salas, J., Casas, P., Murphy, M., López, P., Bulló, M. (2008) The effect of nuts on inflammation *Asia Pac J Clin Nutr*. 17(1):333-6.
76. Gregori Valdés S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana Farmacologica*. (39): 1561-2988.
77. Velásquez, L., Becerra, L., Chávez, C. (2008). Efecto del extracto acuoso del gel de *Aloe vera* "sábila" sobre la fagocitosis por macrófagos de *Mus musculus* BALB/c y la producción de anticuerpos por *Oryctolagus cuniculus*. *Revista Médica Vallejiana*. (5): 7-15.

78. Alonso-Castro, A. J, Juárez-Vázquez, MC., Campos-Xolalpa, N. (2016). Medicinal Plants from Mexico, Central America, and the Caribbean Used as Immunostimulants. Hindawi Publishing Corporation. Departamento de Farmacia, Universidad de Guanajuato. Guanajuato. 1-16.
79. Ghonime, M.G., Shamaa, O.R., Das, S., Eldomany, R.A., Fernandes- Alnemri, T., Alnemri, E.S., y colaboradores. (2015). Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J Immunol.* (8):3881–8.
80. Aderem, A., Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Revista de Immunología.* (17):593–623.
81. Blair, S., Toro, F., Correa AM., Diaz, A., Zableta, J y Carmona, J. (1999). Niveles séricos elevados de interleuquina 10 en pacientes con malaria aguda. *Acta Med Col.* (24): 15-18.
82. Correa, M., Duque, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. (26): 73-86.
83. Sánchez, RP., Sanz, JM., Martín, AP., Martín, ER., Mon, MA., García, MS.(2005). Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva.* (29):151-158.
84. Vogel, D., Glim. J., Drea W., Stavenuitera, M., Breura, P., Amorb, C., Dijkstra, R. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Inmunobiology.* 695-703.
85. Fuentes- Pananá, E. Camorlinga-Ponce, M. Maldonado-Bernal, C. (2009). Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud Publica. México.* (51): 427-433.
86. Mitchell. K., Shah, J., Tsytsikova, L., Campbell, A., Affram, K., Symes, A. (2013). LPS antagonism of TGF- β signaling results in prolonged survival and activation of rat primary microglia. *Journal Neurochemistry.* (129):155-168.
87. López, PJ. (2000). Papel de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno del óxido nítrico, en la génesis de las enfermedades cardiovasculares. *Cardiología al Día* 2000; 3: 14-18.
88. Velasco-Ramírez, SF., Rosales-Rivera, LY., Ramírez-Anguiano, AC., Bitzer-Quintero, OK. (2013) Citocinas y sistema nervioso: relación con crisis convulsivas y epilepsias. *Revista de Neurología.* 57: 7-171.