

**CENTRO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN
ANTI-INFLAMATORIA DEL EXTRACTO NATURAL
DE Mangifera indica L. (VIMANG®)**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Gabino Garrido Garrido

**Ciudad de La Habana
2005**

**CENTRO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN
ANTI-INFLAMATORIA DEL EXTRACTO NATURAL
DE Mangifera indica L. (VIMANG®)**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

**Autor: Lic. Gabino Garrido Garrido
Tutor: Dr. René Delgado Hernández
Asesor: Dr. Alberto J. Nuñez Sellés**

**Ciudad de La Habana
2005**

SÍNTESIS

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que el extracto acuoso de la corteza de M. indica (VIMANG®) tiene un efecto anti-inflamatorio en modelos in vivo de inflamación. En un modelo de edema plantar inducido por LPS y carragenano en ratas, el extracto administrado por vía oral durante tres meses, inhibió tanto la inflamación como los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (FNT α) en los exudados plantares. También el extracto inhibió la producción de esta citocina proinflamatoria en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones. Esta inhibición se produjo al nivel de ARNm.

En experimentos in vitro en macrófagos activados, la producción de prostaglandina E₂, leucotrieno B₄, FNT α y del radical libre óxido nítrico fue inhibida por el extracto. Este efecto también se observó sobre la fosfolipasa A₂ de secreción sinovial humana, la proliferación de linfocitos T humanos y la activación por FNT α del factor de transcripción nuclear NF- κ B en células 5.1, HeLa-Tet-Luc y Jurkat.

Los resultados obtenidos contribuyen a explicar el mecanismo de acción anti-inflamatoria del extracto de M. indica, demostrado por primera vez en este estudio. Parte de estos efectos pudieran atribuirse a la presencia en el extracto de polifenoles y en particular de la mangiferina.

1.1.1.2.2.	Linfocitos T	28
1.1.1.3.	Resolución de la respuesta inflamatoria aguda	29
1.1.2.	Inflamación crónica	30
1.1.3.	Modulación farmacológica de los procesos inflamatorios	31
1.2.	<u>Mangifera indica</u> L.	36
1.2.1.	Usos tradicionales	36
1.2.2.	Extracto acuoso de la corteza de <u>Mangifera indica</u> L	37
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1	Descripción y obtención del material de ensayo	40
2.2.	Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de <u>M. indica</u>	41
2.2.1.	Modelos de inflamación en animales de experimentación	41
2.2.1.1.	Animales y tratamientos	41
2.2.1.2.	Modelo de edema plantar inducido por agentes irritantes (carragenano y LPS) en ratas	41
2.2.1.3.	Modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones	42
2.2.2.	Modelos de evaluación anti-inflamatoria <u>in vitro</u>	43
2.2.2.1.	Ensayo para la determinación de la actividad de la FLA ₂ de secreción	43
2.2.2.2.	Producción de PGE ₂ y LTB ₄ en macrófagos activados...	44
2.2.2.2.1.	Viabilidad celular	44

2.2.2.2.2.	Determinación de PGE ₂ y LTB ₄ en macrófagos activados	44
2.2.2.3.	Producción de FNT α y ON en macrófagos y microglia activados	45
2.2.2.3.1.	Líneas celulares	45
2.2.2.3.2.	Activación de macrófagos RAW264.7 y microglia murina N9.....	46
2.2.2.3.3.	Determinación del FNT α	47
	2.2.2.3.3.1. Análisis por Northern blot para el FNT α	48
2.2.2.3.4.	Determinación de nitratos	49
2.2.2.4.	Determinación de la proliferación de linfocitos T	50
2.2.2.4.1.	Aislamiento de células mononucleares periferales humanas y ensayos de proliferación de linfocitos T	50
2.2.2.4.2.	Análisis citofluorométrico del antígeno de superficie celular y el ciclo celular	50
2.2.2.5.	Determinación de la transcripción nuclear dependiente del factor de transcripción nuclear NF- κ B	51
2.2.2.5.1.	Líneas celulares	51
2.2.2.5.2.	Ensayo de luciferasa	52
2.2.2.5.3.	<u>Western blots</u>	52

2.2.2.5.4. Aislamiento de extractos nucleares y EMSA	53
2.3. Análisis estadístico	54
3. RESULTADOS	56
3.1. Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de <u>M. indica</u> en modelos <u>in vivo</u>	57
3.1.1. Acción del extracto de <u>M. indica</u> sobre la inflamación inducida por carragenano y LPS en ratas	57
Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre la producción de	
3.1.1.1. FNT α en el exudado plantar del edema inducido por carragenano y LPS	58
3.1.2. Efecto del extracto de <u>M. indica</u> en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones. Inhibición de la producción de FNT α y su transcritto primario	58
3.2. Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de <u>M. indica</u> en modelos <u>in vitro</u>	60
3.2.1. Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre la FLA ₂ de secreción.....	60
3.2.2. Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre la liberación de PGE ₂ y LTB ₄ en macrófagos activados	60
3.2.3. Acción del extracto de <u>M. indica</u> y la mangiferina sobre la producción del FNT α y ON en macrófagos y microglia activados.	61

3.2.4.	Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre la proliferación de linfocitos T	63
3.2.5.	Acción del extracto de <u>M. indica</u> sobre el factor de transcripción nuclear NF- κ B	64
3.2.5.1.	Efecto del extracto de <u>M. indica</u> sobre la activación de NF- κ B	64
3.2.5.2.	Acción del extracto de <u>M. indica</u> sobre la degradación de I κ B α y el enlace del NF- κ B al ADN	64
4.	DISCUSIÓN	66
4.1.	El extracto de <u>M. indica</u> inhibe elementos importantes dentro de la cascada del AA como FLA ₂ , PGE ₂ y LTB ₄	69
4.2.	El extracto de <u>M. indica</u> inhibe mediadores proinflamatorios clave tales como FNT α y ON	76
4.3.	El extracto de <u>M. indica</u> inhibe la proliferación de linfocitos T y la activación, inducida por FNT α , del NF- κ B	87
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
5.1.	CONCLUSIONES	97
5.2.	RECOMENDACIONES	98
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Los procesos inflamatorios se desarrollan como parte de los mecanismos de defensa que tienen lugar en el organismo en respuesta a estímulos de diversa naturaleza. Estos estímulos pueden abarcar desde lesiones provocadas por traumatismos mecánicos, procesos isquémicos, efecto de agentes patógenos (virus, parásitos, bacterias), interacciones antígeno-anticuerpo (que se desarrollan por la actividad de los diferentes componentes del sistema inmunológico), hasta la acción de diversos productos químicos. Solo en los casos en que estos factores puedan ser eliminados por la activación de los sistemas de defensa del organismo, no se presentan visiblemente las consecuencias de un proceso inflamatorio ⁽¹⁾.

Existen diversos compuestos endógenos que participan en la reacción inflamatoria, y son conocidos como mediadores de este proceso. Dentro de estas sustancias se encuentran: histamina, serotonina, cininas ⁽²⁾, eicosanoides ⁽³⁾, componentes del complemento, radicales libres ⁽⁴⁾, citocinas ⁽⁵⁾, entre otros.

El factor de necrosis tumoral alfa (FNT α) se encuentra dentro del grupo de las citocinas que poseen propiedades proinflamatorias ⁽⁶⁾, y se ha identificado que puede ser inducido en los procesos inflamatorios, atribuyéndose a esta citocina, un papel protagónico y determinante en el desarrollo de la reacción inflamatoria ⁽⁷⁾. A pesar del importante papel que le ha sido atribuido al FNT α en la fisiopatología de la reacción inflamatoria, se ha comprobado que no constituye el mediador más importante de este proceso, aunque si está dentro de los principales, y no basta su simple inhibición para lograr revertir el desarrollo de un proceso inflamatorio ⁽⁸⁾. También, en la última década, ha sido considerado con un papel importante en la etiología de la reacción inflamatoria, el radical libre óxido nítrico (ON). Esta molécula ha sido estudiada por muchos investigadores dentro de los mediadores a modular en el desarrollo de un nuevo producto anti-inflamatorio ⁽⁹⁾; pero, al

igual que con el FNT α y otras citocinas proinflamatorias, esta simplificación del proceso también resulta errónea ⁽¹⁰⁾.

Otros estudios de gran interés dan especial valor al papel de los eicosanoides y, de manera más directa, a las principales vías metabólicas involucradas en la formación de estos metabolitos, por lo que en los últimos años ha recibido gran atención la posible inhibición selectiva de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), como blanco para el desarrollo de nuevos anti-inflamatorios ⁽¹¹⁾. También esta consideración simplifica un evento dentro de un conjunto de reacciones e interacciones celulares y moleculares de este complejo y multifactorial proceso, que se encuentra asociado al desarrollo de patologías de etiología diversa en las que su control farmacológico resulta decisivo. En este sentido, resulta de gran relevancia el papel que desempeñan las moléculas de adhesión ⁽¹²⁾, la quimiotaxis ⁽¹³⁾, los linfocitos T ⁽¹⁴⁾ y los factores de transcripción nuclear que son los encargados de ordenar la síntesis de más de 50 genes involucrados en el proceso inflamatorio ⁽¹⁵⁾.

Dentro de los fármacos más utilizados en el tratamiento de los procesos inflamatorios se encuentran algunos de naturaleza esteroideal. Los anti-inflamatorios esteroidales disminuyen la inflamación en un tiempo relativamente breve, por estimular la síntesis de lipocortina y esta a su vez inhibir la actividad de la fosfolipasa A₂ y la inducción de diversas citocinas proinflamatorias. Estos fármacos, impiden la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de las membranas celulares que sirve de sustrato para los diferentes sistemas enzimáticos que dan lugar a los mediadores proinflamatorios lipídicos, conocidos como eicosanoides. No obstante, su mecanismo de acción fundamental lo ejercen a través de la inhibición del factor de transcripción nuclear NF- κ B. Uno de los mecanismos principales consiste en la inducción de la expresión del inhibidor citoplasmático del NF- κ B, I κ B, para aumentar la retención citosólica del primero ⁽¹⁶⁾. A pesar de la potente acción anti-inflamatoria que le es atribuida, estos fármacos presentan

numerosos efectos adversos ⁽¹⁷⁾, por lo que ha sido necesario continuar los estudios orientados a la búsqueda de nuevos anti-inflamatorios o disminuir los efectos adversos de los ya existentes.

Los anti-inflamatorios no esteroideos constituyen otro grupo de fármacos, los cuales inhiben la actividad de la ciclooxigenasa, enzima que participa en el metabolismo del ácido araquidónico hasta prostaglandinas y tromboxanos ⁽¹⁸⁾. Estos compuestos, también presentan alta incidencia de efectos adversos y algunos, incluso, no logran modular la inducción de ciertas citocinas proinflamatorias ⁽¹⁹⁾.

Como los leucotrienos desempeñan un papel tan importante en la inflamación, ha tenido un gran impulso el estudio de nuevas drogas que actúen como antagonistas de los receptores de los leucotrienos o inhibidores enzimáticos de la 5-lipoxigenasa directamente, o de la actividad de la proteína activadora de la lipoxigenasa. Con estos fármacos se han obtenido algunos resultados prometedores en el tratamiento del asma ^(20, 21, 22).

Por otra parte, se conoce que las sustancias antioxidantes son capaces de suprimir o prevenir los procesos inflamatorios mediante inducción o prolongación de la vida media de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, o el secuestro de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el proceso, o por quelación de metales que puedan estar implicados en reacciones redox, hechos que en su conjunto limitan la producción de radicales libres de oxígeno ⁽²³⁾.

En general, se puede observar un panorama complejo a la hora de considerar el desarrollo de un fármaco anti-inflamatorio y no puede primar un criterio único, determinante y excluyente, siempre debe situarse como premisa, analizar el complejo y multifactorial proceso que se enfrenta y la gran cantidad de mediadores de todo tipo que en él se presentan ⁽²⁴⁾.

Una fuente importante de productos con interés farmacológico lo constituyen los productos

naturales y en tal sentido, la búsqueda de principios activos con posible acción anti-inflamatoria, también ha estado dentro de las prioridades de quienes investigan en este campo ⁽²⁵⁾.

Desde el propio surgimiento de la humanidad, el hombre ha utilizado las plantas con fines terapéuticos, muchas veces sin conocer los metabolitos responsables de las acciones farmacológicas a ellas atribuidas. En nuestro país, en los últimos años, se ha rescatado el uso de la medicina natural, tanto por la población como por las instituciones sanitarias, con el objetivo de complementar los tratamientos convencionales de numerosas patologías.

Enmarcado en este contexto, y teniendo como premisa la importancia de las fuentes alternativas de medicamentos en el desarrollo de los sistemas de salud de un país, considerando además, que en muchos extractos naturales, dada la diversidad de componentes activos presentes, se pueden lograr acciones farmacológicas diversas, es que se decidió estudiar un extracto acuoso obtenido de la corteza del árbol de Mangifera indica L. (mango) abundante en nuestro país, el cual ha sido utilizado de manera empírica por practicantes de la medicina popular para el tratamiento de diferentes afecciones ⁽²⁶⁾.

De las diferentes partes de la especie M. indica y en particular de los diferentes extractos realizados, se encuentran en la literatura científica numerosos usos en el ámbito farmacológico, como son: su poder antioxidante y mejorador de la calidad de vida en pacientes con neoplasias, en afecciones del tracto gastrointestinal, enfermedades respiratorias agudas, infertilidad, Diabetes mellitus, hiperplasia prostática, afecciones dermatológicas, infecciones microbianas en diversas localizaciones y en lupus eritematoso. También se reflejan las actividades inmunomoduladora, vascular, cardíaca e intestinal ^{(27,}
²⁸⁾.

El Centro de Química Farmacéutica ha desarrollado un nuevo producto obtenido a partir de la experiencia en el uso etnomédico en Cuba del extracto acuoso de la corteza de

Mangifera indica L. y que se comercializa bajo la Marca Registrada VIMANG® como suplemento nutricional o cosmeceútico antioxidante. En el análisis fitoquímico realizado a este extracto se comprobó la presencia de nueve compuestos fenólicos cuyo componente mayoritario fue la glucosilxantona mangiferina. También se determinaron terpenos, azúcares libres, ácidos grasos, polioles ⁽²⁹⁾ y microelementos ⁽³⁰⁾. En investigaciones recientes se demostró que dicho extracto posee una potente acción antioxidante ^(31, 32, 33, 34, 35), así como efectos inmunomodulador ⁽³⁶⁾ y anti-genotóxico importantes ⁽³⁷⁾.

Los antecedentes relacionados anteriormente permiten considerar que este extracto acuoso podría presentar efecto anti-inflamatorio, aspecto que constituye la esencia del presente trabajo. Estudios que avalen la presencia de propiedades anti-inflamatorias en el extracto acuoso de la corteza de M. indica resultan novedosos desde el punto de vista científico, ya que en la literatura científica se encontraron escasos artículos que abordaran este tema. Por otra parte, estos resultarían de gran actualidad si se tiene en cuenta que en los últimos años un número considerable de investigaciones científicas se ha encaminado hacia la búsqueda de nuevas sustancias naturales con propiedades anti-inflamatorias ⁽²⁵⁾.

La demostración de la actividad anti-inflamatoria del extracto de M. indica avalaría su uso en la prevención y el tratamiento de patologías asociadas con la inflamación con el aporte de un valor agregado incalculable a dicho suplemento nutricional y una utilidad práctica y social al presente estudio.

Sobre la base de las premisas antes señaladas se trazó la siguiente hipótesis de trabajo: **"El extracto acuoso de la corteza de M. indica modula la respuesta inflamatoria inducida en diferentes modelos biológicos a través de la regulación de mediadores proinflamatorios y elementos de señalización como el NF-κB"**.

Para dar cumplimiento a la hipótesis anterior se trazaron los objetivos siguientes:

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto de M. indica en modelos in vivo de inflamación.
2. Elucidar aspectos relacionados con el mecanismo de acción anti-inflamatoria del extracto de M. indica en modelos in vitro de inflamación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del extracto acuoso de la corteza de M. indica en modelos experimentales de inflamación como:
 - ◆ Edema plantar inducido por carragenano y LPS en rata.
 - ◆ Modelo de choque endotóxico inducido por endotoxina en ratón.
2. Caracterizar el posible efecto modulador del extracto acuoso de M. indica sobre la producción de prostaglandina E₂, leucotrieno B₄, factor de necrosis tumoral alfa y óxido nítrico en macrófagos y microglia activados.
3. Investigar la posible acción del extracto acuoso de M. indica sobre la actividad de la enzima fosfolipasa A₂, la proliferación de linfocitos T y la expresión del factor de transcripción nuclear NF-κB.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Inflamación. Consideraciones generales

La inflamación se puede definir como un proceso que sucede en todo el tejido mesenquimático vascularizado, ante la acción de un daño físico, químico o biológico, que desencadena sucesivamente fenómenos vasculares, humorales, exudativos, celulares, reparativos y proliferativos, que tienden a limitar la acción del daño. El cuerpo humano está constantemente expuesto a numerosos estímulos, como por ejemplo: agentes infecciosos, isquemias, interacciones antígeno-anticuerpo, lesiones inducidas por agentes químicos y físicos, entre otros. En la mayoría de las circunstancias, la activación de los sistemas de defensa del organismo conduce a la eliminación de estos agentes sin manifestaciones visibles de inflamación. Pero si ellos se encuentran en grandes cantidades, presentes en sitios inusuales, o son capaces de modificar algunas de las funciones del sistema inmunológico, pueden ocurrir daños tisulares como consecuencia de las reacciones inmunes y esto a su vez facilitar el desarrollo de diferentes enfermedades inflamatorias ^(1, 38).

Los signos macroscópicos que suelen acompañar la inflamación: calor (incremento de la temperatura), rubor (eritema), tumor (edema) y dolor (algesia), así como la pérdida de la función tisular, son consecuencia de efectos inducidos por los mediadores proinflamatorios en el flujo sanguíneo local, la permeabilidad vascular, la infiltración de leucocitos y la liberación de agentes inductores de dolor ⁽³⁹⁾.

Las respuestas inflamatorias, por lo general, se producen en seis fases características, cada una de las cuales está mediada por mecanismos diferentes de gran complejidad y con la implicación de numerosos factores: El inductor de un proceso inflamatorio es el insulto patogénico (fase I) que causa activación de células endoteliales (fase II); hay entonces un incremento de la permeabilidad vascular seguido de un edema tisular (fase III). La fase IV

está caracterizada por infiltración de células polimorfonucleares y se observa un proceso regulador autolimitante conocido como apoptosis (fase V) ⁽⁴⁰⁾. Si el proceso inflamatorio persiste tiene lugar una inflamación crónica (fase VI). En algunas condiciones patológicas, tales como enfermedades autoinmunes órgano específicas, la inflamación crónica está presente desde el inicio de la enfermedad ⁽³⁸⁾.

Es importante señalar que cada tipo de estímulo provoca un patrón característico de respuesta que depende de los tipos de mediadores y células inflamatorias que participan en el proceso y el tiempo tomado por ellos para alcanzar el efecto máximo ⁽³⁸⁾.

A escala celular se produce también una serie de eventos que trae consigo la defensa contra los agentes dañinos y la protección de los tejidos. Estos eventos han sido divididos para su estudio en diferentes etapas. Estas etapas involucran al reconocimiento del agente que será destruido, lo cual pone en marcha un sistema de amplificación que conlleva a la producción de mediadores proinflamatorios que “activan” a los linfocitos y leucocitos fagocíticos implicados en la ingestión del agente iniciador de la reacción y en la generación de productos tóxicos, tales como enzimas proteolíticas, especies reactivas de oxígeno, etc. que son responsables de la destrucción de la causa de la inflamación ⁽¹⁾. En dependencia de los agentes que participan en estas etapas se producen diferentes tipos de inflamación.

1.1.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda se inicia en el momento que el agente patogénico (microorganismos, sustancias químicas alérgicas, etc.) evade o destruye las barreras defensivas primarias (piel, mucosas, etc.). El daño en el tejido desencadena la activación de determinadas rutas de señalización que llevan a la producción de mediadores proinflamatorios. Dichos mediadores causan los cambios fisiológicos característicos del proceso inflamatorio. Estos cambios se manifiestan como un incremento del riego sanguíneo al tejido dañado y la extravasación de células y proteínas hacia el foco inflamatorio. A medida que el daño se

elimina, la liberación de mediadores anti-inflamatorios aumenta y de este modo se reduce considerablemente la inflamación y el tejido se regenera ^(1, 38).

Desde el punto de vista clínico, la forma más habitual de confirmar si existe un incremento de actividad inflamatoria ha sido siempre a través de los reactantes de fase aguda. Estos incluyen desde la simple determinación de la velocidad de sedimentación a la medición de proteínas (fibrinógeno, haptoglobina, orosomucoide, entre otros), en especial la proteína C-reactiva, sin que proporcionen, estas metodologías, una información detallada del tipo de inflamación o de las células implicadas ⁽⁴¹⁾. Además, este tipo de reactantes no se suele alterar en ciertos procesos inflamatorios, como ocurre principalmente en las enfermedades alérgicas. Por ello, se han desarrollado ensayos o pruebas específicas para determinar proteínas segregadas por las diferentes células implicadas en los procesos alérgicos (eosinófilos, neutrófilos, mastocitos o basófilos, linfocitos T y monocitos/macrófagos), de tal forma que proporcionen información no sólo del tipo de célula implicada en cada momento, sino también del grado de actividad inflamatoria, lo que permite seguir mejor su curso clínico con o sin tratamiento. Últimamente a estas proteínas se ha añadido la determinación del tipaje fenotípico o expresión de los marcadores de membrana de los linfocitos T u otras células como basófilos, lo que equivale a su actividad en ese momento, así como la determinación de las citocinas que pudieran intervenir en el proceso inflamatorio ⁽⁴²⁾.

El modo en que se inicia el proceso inflamatorio depende en parte de la naturaleza y vía de entrada de la sustancia extraña. Aunque fundamentalmente en toda reacción inflamatoria aguda se puede distinguir la actuación de mediadores moleculares (Tabla 1) y celulares (Tabla 2) comunes ⁽¹⁾.

Tabla 1. Otros mediadores moleculares de la respuesta inflamatoria

Mediador	Funciones
Derivados del complemento	C3a es quimiotáctico para los leucocitos polimorfonucleares y tiene actividad de anafilotoxina, éste da como resultado la producción de ON, aminas vasoactivas y citocinas. C3b se une por un sitio hidrófobo, que aparece luego de ser escindido, a las regiones vecinas de la membrana citoplasmática, que posee receptores específicos para péptidos, lo que permite la adherencia inmune del complejo antígeno-anticuerpo-C3b a estas células y facilita así su fagocitosis. C5a es responsable de la degranulación de los mastocitos y el principal agente quimiotáctico de los neutrófilos en este sistema, también induce la liberación al medio de enzimas lisosomales y mediadores inflamatorios de los leucocitos ⁽⁴³⁾ .
Enzimas lisosomales	Los lisosomas abundan en los leucocitos y son vesículas, delimitadas por una membrana, que contienen enzimas digestivas para degradar moléculas complejas, que destruyen invasores nocivos y restos celulares. Contienen cerca de 40 tipos de enzimas hidrolasas que incluyen proteasas, nucleasas, glicosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y se procesan en el aparato de Golgi. Se distribuyen englobadas en sacos llamados vesículas de transporte que se funden con tres tipos de estructuras envueltas por membranas: endosomas, fagosomas y autofagosomas. Ellas son responsables de la degradación de colágeno, laminina, elastina y otras proteínas estructurales y están implicadas en la inflamación asociada con respuestas inmunológicas y en metástasis ⁽⁴⁴⁾ .
Péptidos quimioatrayentes n-formilados	En los tejidos dañados del hospedero puedan atraer leucocitos a través de la liberación de péptidos formilados ⁽¹⁾ .
Moléculas de adhesión celular	La adhesión de los leucocitos al endotelio vascular constituye uno de los eventos más tempranos en la respuesta inflamatoria. Después de la estimulación del endotelio vascular con citocinas proinflamatorias este expresa a nivel de membrana moléculas de adhesión para los leucocitos circulantes. Algunas de estas moléculas, aparecen solo después de diversas horas y permanecen por tiempos relativamente largos (24 a 72 h); otras se transportan del interior al exterior celular y están presentes sobre la superficie endotelial después de pocos minutos (10 a 12 min) de estimulación para desaparecer rápidamente. Todo esto está relacionado con la necesidad de un reclutamiento inicial rápido, que más tarde se estabiliza por moléculas diversas y que en cierto modo garantizan la migración de los leucocitos al estrato extravascular ⁽⁴⁵⁾ .
Histamina	Papel central en la hipersensibilidad inmediata y en las respuestas alérgicas. Contrae la fibra muscular lisa bronquial y provoca vasodilatación capilar y aumento de su permeabilidad así como la estimulación de terminaciones nerviosas ^(46, 47) .
Cininas	Acción asociada con la producción secundaria de otros mediadores que incluyen prostanoïdes, taquininas, citocinas, productos derivados de células mastoïdes y ON, los cuales refuerzan la idea de la importancia de las cininas en el desarrollo y mantenimiento de los procesos inflamatorio y nociceptivo ⁽⁴⁸⁾ .
Hidroxitriptamina	En presencia de bajas concentraciones de otros agonistas, puede producir la activación máxima de las plaquetas, amplificar la agregación plaquetaria y acelerar la formación del coágulo. Los receptores 5HT ₁ en las células del endotelio median la liberación de ON, mientras que los 5HT ₂ producen contracción del músculo liso y potencian las acciones de la histamina. Por otra parte los receptores 5HT ₃ median una respuesta despolarizadora, que es responsable de provocar prurito y dolor ⁽⁴⁹⁾ .
Quimiocinas	Activan un gran número de tipos celulares como monocitos, linfocitos, basófilos, y eosinófilos. Además de su efecto quimiotáctico sobre leucocitos, las quimiocinas también causan la liberación de mediadores inflamatorios y estimulan la adherencia celular mediante la amplificación de la expresión de las integrinas de los linfocitos ^(50, 51) .
Factor Activador Plaquetario	Aumenta la permeabilidad vascular, la hiperalgesia y promueve el edema con un efecto 1000 veces más potente que la histamina, es un estimulante poderoso de la agregación plaquetaria, estimula también la agregación de los leucocitos polimorfonucleares, la liberación de leucotrienos y enzimas lisosomales y la generación de aniones superóxido. De forma semejante, promueve la agregación de los monocitos y la degranulación de los eosinófilos, la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales y su diapédesis. El FAP y el LTB ₄ son los más potentes quimioatrayentes conocidos ⁽¹⁾ .

Tabla 2. Otros mediadores celulares de la reacción inflamatoria

Mediador	Funciones
Neutrófilos o fagocitos polimorfonucleares	Cantidades elevadas de sustancias proinflamatorias en sangre actúan sobre determinados receptores de membrana que a su vez están acoplados a proteínas G que catalizan la hidrólisis de GTP a GDP e inician una serie de eventos bioquímicos intracelulares como la activación de la fosfolipasa C, la movilización de calcio intracelular y la despolarización de la membrana. Esto provoca la activación y la migración del neutrófilo al foco de inflamación por interacción de moléculas de superficie del propio neutrófilo con moléculas expresadas por las células del endotelio vascular. Tras un proceso de extravasación, el neutrófilo, ya activo, pasa al lugar de inflamación donde lleva a cabo sus funciones de fagocitosis y degranulación ^(52, 53) .
Eosinófilos	Son granulocitos que migran al lugar de inflamación aguda. Son característicos de inflamaciones alérgicas (respiratorias, gastrointestinales y de origen dermatológico). El daño tisular también es una consecuencia de una acumulación de ellos y la subsecuente liberación de productos asociados a los gránulos tales como citocinas y quimiocinas a los sitios de inflamación ⁽⁵⁴⁾ .
Plaquetas	Liberan gran cantidad de mediadores inflamatorios como fibrinógeno, plasminógeno, proteasas, lípidos y serotonina. Algunos de ellos liberados por las plaquetas son activadores directos de los neutrófilos. Después de lesión de las células endoteliales, ellas se adhieren a la superficie endotelial del tejido vascular lesionado y se agregan a ella. A continuación liberan sustancias que aumentan la permeabilidad y factores que activan el complemento, por lo que atraen a los leucocitos ⁽⁵⁵⁾ .
Células Endoteliales	Desempeñan función muy importante en la adherencia y activación de neutrófilos debido a la expresión de moléculas de superficie (selectinas e integrinas) que son reconocidas de forma específica por los neutrófilos. También es importante destacar su capacidad para sintetizar y liberar una amplia variedad de sustancias proinflamatorias ⁽⁵⁶⁾ .

1.1.1.1. Principales mediadores moleculares de la inflamación

1.1.1.1.1. Citocinas

Las citocinas son autacoides de carácter polipeptídico, considerados mediadores solubles de mucho interés en el campo de la inflamación, la hematopoyesis y la respuesta inmune ^(57, 58). Dentro de ellas se encuentran las interleucinas (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.), los interferones gamma y alfa (IFN γ e IFN α), el FNT α y diversas glicoproteínas clasificadas como factores estimuladores de colonias que regulan la proliferación y diferenciación de los principales componentes hematopoyéticos medulares ^(59, 60, 61).

Las citocinas desarrollan su acción a partir de uniones a receptores específicos en la superficie de las células por los cuales poseen un alto grado de afinidad ⁽⁶²⁾. Estas pueden regular el crecimiento y la actividad de muchas células in vivo como factores de amplificación en la cascada de eventos inflamatorios ⁽⁶³⁾.

Por otra parte, se plantea que las IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5 desempeñan un papel importante en la inducción del sistema endotelial en procesos inflamatorios y enfermedades cardiovasculares ⁽⁶⁴⁾.

Por el contrario, se ha encontrado que la IL-10 tiene capacidad para inhibir la hiperalgesia inflamatoria provocada por la IL-1, IL-6 y la bradicinina ⁽⁶⁵⁾. La IL-10 forma parte de un grupo de citocinas llamadas citocinas anti-inflamatorias, que están constituidas por una serie de moléculas inmunorreguladoras que controlan la respuesta de las citocinas proinflamatorias.

Las citocinas desarrollan su acción a partir de uniones a receptores específicos en la superficie de las células por los cuales poseen un alto grado de afinidad ^(62, 66) y la producción de ellas puede ser regulada por diversos estímulos inductores a nivel transcripcional. La producción constitutiva de ellas usualmente es baja o ausente ⁽⁶⁷⁾.

1.1.1.1.1. Factor de necrosis tumoral alfa (FNT α)

El FNT α es una citocina de gran importancia en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune ⁽⁶⁸⁾. Ha sido considerado como el mediador principal en la mortalidad inducida por LPS. Los monocitos y macrófagos son las principales fuentes de esta citocina, aunque también se ha reportado su síntesis por linfocitos, neutrófilos, microglia, queratinocitos, células Kupffer, mastocitos, sinoviocitos y condrocitos ^(69, 70). El FNT α puede ser detectado rápidamente en sangre al tratar animales de experimentación con LPS, en los que se alcanzan niveles de este en el orden de los nanogramos. Su producción también ha sido comprobada en humanos (voluntarios sanos) tratados con LPS, en pacientes portadores de tumores malignos, sépticos y con enfermedades crónicas ^(7, 69). El LPS constituye el mayor inductor de dicha citocina. También el LPS puede causar fiebre, aumento del cortisol y de los niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma ⁽⁷¹⁾. En el choque endotóxico inducido por LPS hay un aumento brusco del FNT α , dicho incremento es considerado transitorio ya que solo se mantiene en las tres primeras horas después de comenzado el proceso ⁽⁷²⁾. Esto se debe a que se produce el metabolismo del complejo FNT-receptor en las células y la fracción de esta citocina que no se unió con sus receptores de membrana, se asocia a receptores solubles plasmáticos específicos. Este otro complejo, formado por la unión entre el FNT α y el receptor plasmático, es eliminado por la orina y la bilis ⁽⁷³⁾.

Las acciones del FNT α están mediadas, al menos, por dos tipos de receptores FNT α -R1 (p55) y FNT α -R2 (p75), los cuales se encuentran situados en la membrana citoplasmática de las células blanco ⁽⁷⁴⁾. Con la unión FNT α -receptor comienza el aumento de la permeabilidad de la membrana de dichas células blanco, lo cual continúa con un influjo de

calcio extracelular, la activación de la fosfolipasa A₂ y por tanto, el aumento de ácido araquidónico intracelularmente y posteriormente de prostaglandina E₂ ⁽⁷⁵⁾.

El FNT α induce la síntesis de ILs ⁽⁷⁶⁾, y de la sustancia P, un péptido capaz de provocar filtración vascular de los constituyentes plasmáticos en el área inflamada, además de ser un potente algésico ⁽⁷⁷⁾. También, estimula la síntesis de adenosina, un vasodilatador que controla el flujo sanguíneo local e inhibe la función de los neutrófilos ⁽⁷⁸⁾, el factor de crecimiento nervioso, así como la síntesis del péptido relacionado con el gen de la calcitonina ⁽⁷⁹⁾. Además, conjuntamente con el IFN γ , amplifica la producción de aniones superóxido por los neutrófilos y la biosíntesis de ON ⁽⁸⁰⁾. Se ha comprobado que el FNT α posee acción autocrina, por lo que produce un aumento de su síntesis en las propias células que lo producen (efecto llevado a cabo por retroalimentación positiva). Otro de los resultados obtenidos en relación con esta citocina es que ella produce activación e inducción de diversos sistemas enzimáticos de gran importancia en el proceso inflamatorio, así como modulación en la transcripción de genes correspondientes a otras citocinas, como la IL-2, IL-6 y el IFN γ ^(63, 67). Por ello, la toxicidad provocada por el FNT α puede ser atribuida en parte a la acción directa de este sobre los tejidos y, además, a la acción de otros mediadores, entre los cuales se destaca el radical ON ⁽⁸¹⁾.

También el FNT α activa la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) latente en las células T infectadas ⁽⁸²⁾, por lo que aparece como un posible co-factor de la replicación del VIH en el desarrollo del SIDA. El aumento que produce el FNT α en la expresión de muchos genes para diversas proteínas y mediadores inflamatorios se ha comprobado que está relacionado con la estimulación que produce sobre el factor de activación nuclear NF- κ B. Este factor constituye un importante promotor en la activación,

a nivel transcripcional, de los mecanismos de traducción de señales, que amplifican la acción proinflamatoria del FNT α ⁽⁸³⁾.

Existen sustancias que pueden modular de alguna manera la producción de FNT α como el extracto acuoso de la raíz de la planta Dichoroa febrifuga Lour. ⁽⁸⁴⁾ y compuestos químicos como los flavonoides, los cuales además de ser ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes ⁽⁸⁵⁾ y disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares ya que protegen del daño vascular ⁽⁸⁶⁾, disminuyen la producción del FNT α y otros mediadores de gran relevancia en las reacciones inflamatorias ^(87, 88). Esta supresión en la producción del FNT α resulta a nivel del ARNm ⁽⁸⁹⁾. Otras evidencias demuestran que la síntesis del FNT α puede ser regulada a nivel transcripcional por los metabolitos de la vía del ácido araquidónico (los productos de la acción de la ciclooxigenasa, prostaglandina E₂ fundamentalmente, y la lipoxigenasa, leucotrienos) y que el incremento en la acumulación de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), por activación de las vías enzimáticas relacionadas con la generación de ellos (adenilato ciclasa y guanilato ciclasa, respectivamente), constituyen también importantes factores que pueden participar como señales reguladoras a nivel transcripcional en la síntesis de FNT α ^(7, 87, 90, 91).

1.1.1.1.2. Fosfolipasas A₂

La estructura básica de todas las membranas celulares es una bicapa lipídica, uno de sus componentes fundamentales son los fosfolípidos, constituidos por una molécula de glicerol con una cabeza hidrofílica y una cola hidrófoba con dos cadenas de ácidos grasos unidas por un enlace éster al esqueleto molecular. En los fosfolípidos de membrana de las células que participan en la respuesta inflamatoria la posición 1 está ocupada con ácidos saturados, mientras que en la posición 2, generalmente, se encuentran ácidos insaturados, fundamentalmente ácido araquidónico ⁽⁹²⁾. El hecho de que menos del 0,02 % de este ácido

se presente en las células en forma no esterificada sugiere que la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana y las enzimas que participan en el proceso tengan enorme importancia en la producción de los eicosanoides endógenos ⁽⁹³⁾.

La hidrólisis del ácido graso de la posición 2 del glicerol y la formación de lisofosfolípidos, precursores de los mediadores inflamatorios lipídicos eicosanoides y el factor activador plaquetario respectivamente, que muestran una potente y relevante actividad biológica en la patogénesis de las reacciones inflamatorias ⁽³⁾, ocurre por la acción de una familia de enzimas conocidas como fosfolipasas A₂ (FLA₂s) (EC 3.1.1.4) ^(94, 95).

Las FLA₂s participan en el proceso inflamatorio por su capacidad para movilizar ácido araquidónico desde los fosfolípidos. El ácido araquidónico es el sustrato de la prostaglandina H sintasa 1 y 2 (ciclooxigenasas 1 y 2, respectivamente) que lo convierte en prostaglandinas y tromboxanos. Las prostaglandinas activan receptores celulares que a su vez inician cascadas de señales que involucran proteínas G y AMPc. Por otra parte, el ácido araquidónico también es el sustrato de enzimas lipoxigenasas que lo convierten en leucotrienos, mediadores importantes que participan en la quimiotaxis y la respuesta anafiláctica. De esta manera, las FLA₂s desempeñan un papel muy importante en el daño celular por su capacidad para mediar la respuesta inflamatoria ^(96, 97).

Desde 1997, las FLA₂s han sido clasificadas de acuerdo a su secuencia de nucleótidos ⁽⁹⁸⁾ al menos en 10 grupos (I-X). Una clasificación previa, y que aún mantiene su vigencia, está basada en si la FLA₂ es secretada por la célula (sFLA₂), Ca²⁺-dependiente y citosólica (cFLA₂) o Ca²⁺-independiente (iFLA₂).

Las isoformas sFLA₂ requieren cantidades milimolares de Ca²⁺ para su actividad, tienen baja masa molecular (14-18 kDa) y no presentan selectividad para los fosfolípidos araquidonilados (tipos I-III, V, IX y X). Esta clase incluye a sFLA₂s aisladas de veneno de

serpiente (grupo IA) y de páncreas (grupo IB). El grupo IIA incluye a sFLA₂s inicialmente aisladas de plaquetas humanas y aquellas liberadas en fluidos inflamatorios como el sinovial de pacientes con artritis reumatoide y el broncoalveolar de pacientes con asma bronquial ⁽⁹⁹⁾.

Las isoformas cFLA₂ se encuentran en el citosol, tienen masa molecular más alta (~ 85 kDa), requieren cantidades micromolares de Ca²⁺ para la translocación a la membrana de fosfolípidos y son selectivas para fosfolípidos araquidonilados (tipos IVA y B). Las iFLA₂ están localizadas tanto en el citosol como en fracciones de membranas, no requieren Ca²⁺ para su actividad y tienen una masa molecular entre 29 - 85 kDa ^(100, 101). Balsinde y cols. han propuesto que la acción de la forma citosólica presente en compartimentos celulares como la membrana nuclear y(o) el retículo endoplasmático genera una gran liberación de ácido araquidónico intracelular, que produce cambios en la asimetría de la bicapa lipídica lo que es una señal estimulante para la forma secretable en la superficie celular que comienza a hidrolizar gran cantidad de fosfolípidos, obteniéndose así una fuente importante de mediadores proinflamatorios. Entre otros factores que pueden estimular la acción de la FLA₂ secretable por desestabilización de la asimetría de la membrana se encuentra también la producción de los subproductos de la vía de la esfingomielinasa, tales como las ceramidas y el diacilglicerol ^(102, 103).

La iFLA₂, cuyo sustrato preferencial es el ácido araquidónico de la posición sn-2 de moléculas de plasmalógenos, parece jugar un papel importante en la remodelación de las membranas, lo cual puede influir de manera importante en la distribución subcelular de ácido araquidónico entre los diferentes compartimentos y en la cantidad relativa del ácido graso en cada uno de ellos ⁽¹⁰⁴⁾.

1.1.1.1.3. Eicosanoides

Se denominan eicosanoides a las familias de prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, y ácidos hidroxieicosanoicos, que derivan de los ácidos grasos esenciales de veinte átomos de carbono, que pueden tener tres, cuatro o cinco dobles enlaces: ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico (ácido dihomo γ linoleico), ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico (ácido araquidónico) y ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoico ⁽¹⁰⁵⁾. En el hombre, el araquidonato es el precursor más abundante. Estos ácidos grasos están esterificados a los fosfolípidos de las membranas celulares y se liberan por la acción de la FLA₂ como se ha señalado previamente. Estas moléculas pueden sufrir oxigenaciones en varios puntos de su cadena carbonada, por las ciclooxigenasas, para dar lugar a las prostaglandinas, o por las lipoxigenasas para dar paso a los leucotrienos, lipoxinas y ácidos hidroxieicosanoicos. Existe también una tercera vía que involucra a las enzimas del citocromo P₄₅₀ que catalizan la formación de ácidos grasos mono y di-hidroxilados, así como ácidos epoxieicosatrienoicos ^(106, 107).

1.1.1.1.3.1. Prostaglandinas (PGs)

Las prostaglandinas endoperóxido sintasas, también llamadas ciclooxigenasas (COXs), catalizan el primer paso en la conversión del ácido araquidónico a PGs y metabolitos relacionados. Las ciclooxigenasas (EC 1.14.99.1) presentan dos isoenzimas, una constitutiva (COX-1) y otra inducible (COX-2), son proteínas glicosiladas, homodiméricas, unidas a membrana que poseen dos actividades catalíticas distintas y requieren ambas la presencia de un grupo hemo; una ciclooxigenasa que oxigena y cicla al ácido araquidónico para producir PGG₂ y una actividad peroxidasa que reduce PGG₂ a PGH₂ que da lugar al resto de los tipos de prostaglandinas. Ambos sitios catalíticos son adyacentes pero espacialmente diferentes ^(108, 109).

Aunque ambas isoenzimas tienen solo un sesenta por ciento de homología, las regiones responsables de la actividad enzimática presentan una homología mayor del noventa por ciento y tienen las dos la misma afinidad y capacidad de convertir el ácido araquidónico en PGH_2 . Sin embargo, mientras la COX-1 principalmente se restringe al ácido araquidónico, la COX-2 es capaz de metabolizar como sustratos a otros ácidos grasos. Ambas isoenzimas se encuentran presentes en el retículo endoplasmático, aunque la forma inducible aparece también en la envoltura nuclear ⁽¹¹⁰⁾.

Las prostaglandinas están divididas en series de acuerdo con los sustituyentes del anillo de ciclopentano, que conforma el esqueleto de dichas moléculas, así la serie E son 9-ceto, 11 hidroxil sustituidas, la serie F, 9,11 hidroxil sustituidas y las de la serie D 9-hidroxil, 11 ceto sustituidas. La prostaciclina (PGI_2), que se forma a partir de la acción de la prostaciclina sintasa, presenta un segundo anillo agregado al primero, mientras que el tromboxano (TXA_2), formado por la acción catalizadora de la tromboxano sintasa, contiene un anillo de seis miembros, en lugar del ciclopentano del resto. Estas clases principales se subdividen de acuerdo al número de dobles enlaces en las cadenas laterales. Esto se indica con el subíndice 1, 2, ó 3 y refleja el ácido graso precursor, por ejemplo, las prostaglandinas derivadas del araquidonato llevan el subíndice 2, y son las principales en los mamíferos ⁽¹¹⁰⁾.

Las PGs son producidas en los procesos patológicos y sus actividades biológicas contribuyen al desarrollo de la inflamación. La PGE_2 es un potente dilatador del músculo liso vascular, lo cual provoca parte de la vasodilatación y el eritema observados en la inflamación aguda. La vasodilatación incrementa el flujo de sangre a través de los tejidos inflamados y esto aumenta la extravasación de fluido (edema) causado por agentes que incrementan la permeabilidad capilar como la histamina. La PGE_2 actúa sinérgicamente con otros mediadores que producen dolor y es además un potente agente pirético. Otros

productos de la COX, tales como la PGD₂, la PGF₂α, y el TXA₂, también tienen actividad biológica pero realmente ellas se encuentran en niveles que corresponden a menos del 25 % de las concentraciones de PGE₂ ^(111, 112).

Las PGs ejercen sus efectos biológicos en los diferentes tejidos a través de una familia de ocho receptores específicos en las membranas plasmáticas que se acoplan a proteínas G y generan segundos mensajeros que provocan las respuestas celulares ^(113, 114). Según la clasificación de estos receptores, existen receptores específicos para TX (TP), PGI (IP), PGF (FP), PGD (DP) y PGE (EP), este último con cuatro subtipos (1, 2, 3, 4) que responden al agonista natural PGE₂, pero que difieren en sus respuestas a varios análogos. Aunque estos subtipos han sido caracterizados farmacológicamente, ninguno de ellos ha sido aislado y su caracterización molecular aún es insuficiente ^(115, 116).

1.1.1.1.3.2. Leucotrienos (LTs)

Las lipoxigenasas (LOXs) constituyen una familia de enzimas dioxigenasas citosólicas que catalizan la oxigenación estereoespecífica de los carbonos 5, 12 ó 15 del ácido araquidónico y otros ácidos grasos poli-insaturados, para convertir los 1,4 dobles enlaces en 1,3 hidroperóxidos (ácidos hidroperóxieicosanoicos, HPETEs), los cuales sufren transformaciones metabólicas que producen diferentes compuestos en dependencia de la lipoxigenasa que actúe. Así la 12 lipoxigenasa (EC 1.13.11.31) da lugar a ácidos 12 hidroxieicosatetraenoicos, (12-HETEs) y a dos hepoxilinas A₃ y B₃, la 15 lipoxigenasa (EC 1.13.11.33) da lugar a ácidos 15 hidroxieicosatetraenoicos, (15-HETEs) y lipoxinas ^(117, 118).

La 5 lipoxigenasa (EC 1.13.11.34), que en los mamíferos es una enzima dependiente de calcio y de una proteína activadora integral de la membrana nuclear, necesaria para la translocación de la enzima, produce ácidos 5-HETEs y un epóxido (LTA₄) que es rápidamente metabolizado por hidrólisis a LTB₄ (por medio de la enzima LTA₄ hidrolasa) o por adición de glutatión a los LTs C₄, D₄ y E₄ conocidos en su conjunto como la

sustancia de acción lenta de la anafilaxia o cisteinil-leucotrienos. Al igual que las PGs, las clases principales (A, B, C, D, E) se subdividen de acuerdo al número de dobles enlaces en las cadenas laterales. Esto se indica con el subíndice 4 ó 5 y refleja el ácido graso precursor, por ejemplo, los leucotrienos derivados del araquidonato llevan el subíndice 4 (119, 120).

Los LTs comprenden un grupo de mediadores lipídicos altamente potentes que actúan a concentraciones nanomolares en la comunicación intercelular, la transducción de señales y la defensa del organismo. Son predominantemente producidos por los macrófagos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos, y su síntesis transcelular a partir de LTA_4 ocurre en las células endoteliales, plaquetas, mastocitos, linfocitos y eritrocitos (121).

Se ha demostrado que los LTs ejercen sus efectos mediante su unión a receptores acoplados a proteínas G. Existe un tipo de receptor del LTB_4 llamado receptor BLT, mientras que los receptores farmacológicamente definidos para LTC_4 , D_4 y E_4 han sido llamados receptores cisteinil-leucotrienos (Cys-LT; Cys- LT_1 y Cys- LT_2) que son independientes para los LTC_4 y LTD_4 (13, 122, 123).

Los efectos biológicos de los LTs en la inflamación son numerosos, por ejemplo el LTB_4 estimula la quimiotaxis, quimiocinesis, agregación, degranulación y la adherencia al endotelio vascular de los leucocitos, estimula la liberación de enzimas lisosomales, propicia la elevación de la expresión de receptores de C3b y la liberación de calcio entre otros efectos. Por su parte, los LTs C_4 , D_4 , E_4 , son potentes constrictores del músculo liso y promueven el edema y la secreción de mucus. Los LTs también activan a la FLA_2 en los primeros pasos de la cascada inflamatoria (124). Estos eicosanoides desempeñan un papel importante en el asma, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, entre otras (125, 126).

1.1.1.1.4. Radicales libres y estrés oxidativo

La presencia de radicales libres puede ser ventajosa para la célula. De hecho, ellos son producidos continuamente en el organismo y muchos son necesarios para cumplir determinadas funciones biológicas. Sin embargo, en el momento que tiene lugar una sobreproducción de radicales libres o los sistemas de defensa antioxidantes están debilitados por alguna razón, se produce un estrés oxidativo que puede producir daño celular ⁽¹²⁷⁾.

Existen sistemas intracelulares que producen radicales libres de oxígeno de manera sistemática tales como: sistemas de transporte mitocondrial ⁽¹²⁸⁾ y microsomal ⁽¹²⁹⁾; auto-oxidación de moléculas pequeñas como catecolaminas, flavinas, tetrahidropterinas, quinonas y tioles ⁽¹³⁰⁾; actividad de algunas enzimas citoplasmáticas como xantina oxidasa y aldehído deshidrogenasa ⁽¹³¹⁾ y de membrana como LOX y COX en las vías de síntesis de LTs y PGs y TXs, respectivamente ^(132, 133) y la NADPH-oxidasa, la principal fuente de radicales superóxido durante la explosión respiratoria de las células fagocíticas activadas ⁽¹³⁴⁾.

Dentro de los radicales libres de mayor importancia en los organismos vivos se encuentran el radical hidroxilo (OH[•]), superóxido (O₂^{•-}), el óxido nítrico (ON[•]) y el peroxilo (RO₂[•]). El peroxinitrito (ONOO[•]), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el singlete de oxígeno (¹O₂) no son radicales, pero pueden conducir fácilmente a reacciones radicalarias en los organismos vivos ⁽¹³⁵⁾. La gran reactividad de ellos conduce a que tengan una corta vida media y un pequeño radio de acción. No obstante, ellos son capaces de reaccionar con todos los componentes celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos) y dan lugar a alteraciones metabólicas y celulares ⁽¹²⁷⁾.

Existen evidencias indirectas sobre el papel que desempeñan las especies reactivas del oxígeno en la inflamación, ya que la terapia con antioxidantes ha sido exitosa en varios

procesos inflamatorios y enfermedades infecciosas. Además, se ha demostrado que muchos fármacos anti-inflamatorios, existentes en el mercado, tienen propiedades antioxidantes ^(136, 137) y pueden alcanzar niveles efectivos de actividad antioxidante *in vivo* ⁽¹³⁸⁾.

El ácido acetil salicílico y otros fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, inhiben las funciones de los neutrófilos, células que al ser activadas son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno ⁽¹³⁹⁾. Otros derivados de los salicilatos como la sulfasalazina y su metabolito 5-amino salicílico (5-ASA) que son usados en el tratamiento tanto de las enfermedades reumáticas como de la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, son ambos, secuestradores directos de especies reactivas de oxígeno ⁽¹⁴⁰⁾. El paracetamol, aunque no constituye un anti-inflamatorio potente se clasifica dentro de este grupo, es un secuestrador de radicales superóxido y lipídicos ⁽¹⁴¹⁾. Dentro de los esteroides glucocorticoides algunos son inhibidores de la peroxidación lipídica ⁽¹⁴²⁾ y otros obtenidos por síntesis, carentes de actividad glucocorticoide, presentan actividad quelante de hierro y(o) secuestradora de especies reactivas de oxígeno ⁽¹⁴³⁾. Por lo tanto, los fármacos anti-inflamatorios ejercen, al menos, parte de su actividad por interacción con las especies reactivas de oxígeno o los sistemas que las generan.

1.1.1.1.4.1. Oxido nítrico (ON)

El ON 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 no específica y participa en el complejo mecanismo de daño tisular como un mediador importante de los procesos inflamatorios y la apoptosis ⁽⁹⁾.

La base bioquímica para la citotoxicidad del ON se sustenta en su capacidad para reaccionar con enzimas que contienen hierro en su centro activo (por ejemplo, puede

estimular la actividad de la COX, por su reacción con el grupo hemo del sitio activo de esta enzima) y en la síntesis del ADN. Además, este agente reacciona con glutatión y disminuye su contenido intracelular e incrementa la susceptibilidad al estrés oxidativo. También el ON es capaz de reaccionar con radicales libres y dar lugar a peroxinitritos, lo que eleva su toxicidad ⁽¹⁴⁴⁾.

Numerosos estudios en animales de experimentación muestran que la excesiva producción de ON, desempeña un importante papel en las respuestas inflamatorias, ya que promueve los signos clásicos de ella, así como el daño tisular ⁽¹⁴⁵⁾.

La vía metabólica conocida como L-arginina:ON es la fuente fundamental para la producción de ON en células de mamíferos por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (ONSs), todo ello en presencia de oxígeno molecular y un conjunto de cofactores apropiados. Su descubrimiento constituyó uno de los hechos más relevantes de las investigaciones biomédicas en el siglo XX. Las células endoteliales y neuronales expresan isoformas de ONS (ONS_e y ONS_n, respectivamente) que producen ON a bajos niveles, esta enzima se conoce también como ONS constitutiva (ONS_c). La enzima responsable del papel del ON en los procesos inflamatorios es la ONS inducible (ONS_i, ONS₂ u ONS tipo II), la cual no es típicamente expresada en células en reposo y debe ser inducida por citocinas o productos microbianos ^(146, 147). En general, la activación de todas las isoformas de ONS requieren de dinucleótido de adenina-flavina, mononucleótido de flavina y tetrahidrobiopterina como cofactores y la catálisis que ellas desempeñan es dependiente de fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina forma reducida (NADPH).

La ONS_i ha sido detectada en células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas, queratinocitos, células mesangiales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos cardíacos, entre otros ^(144, 148). Ella produce ON en cantidades mil veces superiores a las formadas por el sistema constitutivo. En muchos estudios se ha obtenido como

resultado que el ON liberado por la estimulación del sistema inducible causa profunda vasodilatación, daño celular y disfunción cardíaca. También se ha comprobado su participación en mecanismos defensivos del organismo contra las células tumorales y contra infecciones provocadas por bacterias, hongos, parásitos intracelulares y determinados virus. Esto puede realizarse debido a la acción citostática y citotóxica que ha sido comprobada para dicho radical ^(9, 149). En el choque endotóxico producido por LPS, la inducción que se produce de la ONS está precedida de un aumento en la síntesis del FNT α y se ha demostrado que la conexión existente entre la estimulación (administración de LPS) y el posterior incremento en la síntesis del FNT α , no es más que un proceso mediado por la producción de ON ⁽¹⁵⁰⁾. Aunque las tres isoformas ONS están involucradas en mayor o menor grado en el proceso inflamatorio, el papel que desempeña la ONSi parece ser dominante ⁽¹⁴⁴⁾. Además, la expresión de la ONSi, después de estimulación por endotoxina bacteriana u otras citocinas, está acompañada por la liberación de otros mediadores, tales como PGE₂ y PGI₂, vía COX ⁽¹⁵¹⁾. La producción sinérgica de PGs y ON parece tener un vínculo crucial entre las vías de ONS y COX en ciertas condiciones patológicas ⁽¹⁴⁴⁾. La activación celular por componentes de la pared celular de bacterias gram-positivas o negativas resulta en la producción de una variedad de mediadores inflamatorios que son esenciales para el desarrollo del choque séptico y sus complicaciones ⁽¹⁵²⁾.

Aunque la expresión de ONSi protege el hígado en la inflamación hepática aguda, esta puede producir necrosis hepática en la isquemia-reperfusión y en el choque hemorrágico ⁽¹⁵³⁾. También se ha demostrado in vitro que el factor de transcripción nuclear NF- κ B desempeña un papel fundamental en la regulación transcripcional de los genes, humano y murino, de la ONSi activados por LPS y citocinas ⁽¹⁵⁴⁾.

El papel que desempeña el ON en la inflamación crónica también ha sido establecido. El ON estimula la producción del FNT α en sinoviocitos y condrocitos lo que promueve la

degradación del cartílago articular implicada en ciertas enfermedades reumáticas y lupus eritematoso ⁽¹⁵⁵⁾. También ha sido reportada su influencia en dermatitis ⁽¹⁵⁶⁾, diabetes ⁽¹⁵⁷⁾, arteriosclerosis ⁽¹⁵⁸⁾, asma ⁽¹⁵⁹⁾, cicatrización ⁽¹⁶⁰⁾, enfermedad inflamatoria intestinal ⁽¹⁶¹⁾, entre otras ⁽¹⁴⁴⁾.

Existen sustancias que pueden inhibir la producción de ON. Dentro de tales compuestos se agrupan los flavonoides ⁽⁸⁷⁾ y los análogos metilados de la L-arginina [N-monometil-L-arginina (L-NMMA) y N-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME), entre otros], los cuales constituyen inhibidores competitivos específicos para todas las isoformas de la ONS, causan actividad vasoconstrictora in vitro y una respuesta hipertensiva en animales y humanos, como resultado de la inhibición del ON producido endógenamente y que resulta muy importante para el mantenimiento de la presión arterial ⁽¹⁴⁴⁾.

1.1.1.1.5. Factor de transcripción nuclear κ B

Existen desórdenes inflamatorios considerados como 'enfermedades de expresión de genes' en los cuales se activa el programa de genes proinflamatorios del organismo. La complejidad de este proceso puede atribuirse a la inducción de la expresión de un vasto número de proteínas con diversas acciones que juntas causan eventos moleculares y celulares que diferencian al tejido normal del inflamado. La característica principal que distingue a los genes que son activados en las enfermedades inflamatorias es que su expresión puede ser inducida por citocinas como el FNT e IL-1, entre otros agentes proinflamatorios. Al interactuar con los receptores de la superficie celular, FNT e IL-1 activan una forma citoplasmática del factor de transcripción nuclear NF- κ B ^(15, 162, 163). Además, se conoce que más de 50 genes pueden ser activados en la inflamación y sus respectivos ADNs presentan secuencias ligandos para NF- κ B ⁽¹⁵⁾.

Este factor de transcripción nuclear está particularmente preparado para la defensa en aquellas condiciones que atenten contra la vida (infecciones virales y bacterianas o estrés

físico) y realiza semejante función porque se encuentra en el citoplasma de casi todas las células. En el tejido crónicamente inflamado, en el que los estímulos patogénicos externos parecen estar ausentes, FNT e IL-1 actúan como inductores endógenos primarios de NF- κ B. Cuando las células son expuestas a FNT o IL-1, una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de sus inhibidores, por lo que NF- κ B es liberado para entrar en el núcleo y activar la expresión de genes ⁽¹⁶⁴⁾. Estos complejos citoplasmáticos que son capaces de efectuar una translocación nuclear son conocidos como la familia de transcripción NF- κ B/Rel. Esta incluye a NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, y c-Rel ^(165, 166). Muchos miembros de esta familia (con excepción de RelB) pueden "homodimerizarse", así como formar heterodímeros entre ellos. La forma activada de NF- κ B que más prevalece es un heterodímero que consiste en una subunidad p50 o p52 y una p65, la cual contiene dominios de transactivación necesarios para la inducción de genes ⁽¹⁶⁴⁾.

La expresión de proteínas de NF- κ B puede proveer especificidad por sitios y eventos en respuesta a estímulos particulares. Las proteínas p50 y p65 desempeñan un papel fundamental en la producción constitutiva de IL-6 en los fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide ⁽¹⁶⁷⁾, mientras la activación de p65 por trombina regula la expresión de ICAM-1 en células endoteliales ⁽¹⁶⁸⁾. Los heterodímeros p50 y p65 están íntimamente involucrados en la activación de genes proinflamatorios por IL-1 o FNT α en monocitos humanos, y estos efectos son bloqueados por la citocina anti-inflamatoria IL-10 ⁽¹⁶⁹⁾.

Estas diferencias, junto a múltiples variaciones en los sitios de enlace semejantes a NF- κ B que interactúan con ciertos hetero y homodímeros NF- κ Bs, permiten a las células responder al ambiente externo en el tiempo apropiado y con los genes correctos ⁽¹⁷⁰⁾.

El NF- κ B existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada a proteínas reguladoras llamadas inhibidores de κ B (I κ B), de los cuales los más importantes pueden ser I κ B α , I κ B β , e I κ B ϵ ⁽¹⁶⁵⁾. La fosforilación de I κ B, un paso importante en la activación de NF- κ B, está mediada por un complejo de proteínas cinasas llamado IKK. El complejo IKK contiene al menos tres subunidades, que incluyen las cinasas IKK α e IKK β (también llamadas IKK-1 e IKK-2, respectivamente), ⁽¹⁷¹⁾ y la subunidad reguladora IKK- γ ⁽¹⁷²⁾. La activación de IKK inicia la fosforilación de I κ B α en NH₂- terminales específicos de residuos de serina. I κ B α fosforilado es entonces "ubiquitinizado", lo que lo convierte en un blanco para la degradación por el proteosoma 26S ⁽¹⁷³⁾, libera el dímero NF- κ B del complejo NF- κ B-I κ B citoplasmático y las proteínas NF- κ Bs se translocan al núcleo, donde se unen a elementos específicos en las regiones promotoras de los genes diana para activar así la expresión génica. IKK también fosforila I κ B β e I κ B ϵ ⁽¹⁷⁰⁾.

La activación de NF- κ B incrementa la expresión de moléculas de adhesión E-selectina, VCAM-1, e ICAM-1, mientras la inhibición de NF- κ B reduce la adhesión y trans migración de leucocitos ⁽¹²⁾. También su activación está involucrada en la inducción ⁽¹⁶⁵⁾ o inhibición ^(16, 174) de la apoptosis.

NF- κ B es altamente activado en sitios de inflamación en diversas enfermedades y puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como FNT α , IL-1 β , IL-6, e IL-8, quimiocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), COX-2 y ONSi ^(16, 166, 201).

En artritis reumatoide NF- κ B es sobre-expresado en la membrana sinovial inflamada y su actividad puede aumentar el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de mediadores proinflamatorios tales como IL-1, IL-6, IL-8, y FNT α ^(175, 176). Las subunidades

p50 y p65 han sido localizadas en el núcleo de líneas celulares sinoviales así como en células mononucleares de esa región.

Otros mediadores moleculares de la inflamación aparecen en la Tabla 1.

1.1.1.2. Algunos mediadores celulares de la reacción inflamatoria

1.1.1.2.1. Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas que migran a los tejidos al igual que los neutrófilos. Estas células activadas son capaces, además de fagocitar, de producir y liberar proteínas antibacterianas y mediadores proinflamatorios. Este tipo celular complementa la función de los neutrófilos en los procesos de inflamación aguda, pero en cambio tienen un papel central en los procesos de inflamación crónica, sobre todo por su capacidad de presentar antígeno y activar la respuesta inmune específica celular ⁽¹⁾.

1.1.1.2.2. Linfocitos T

La respuesta inmune estimulada por linfocitos T requiere que el antígeno sea presentado en la superficie de macrófagos en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, que son expresadas en células inflamatorias tales como los macrófagos. Estas células fagocitan y degradan proteolíticamente el antígeno en pequeños péptidos. Algunos de estos se asocian por uniones no covalentes con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y son transportadas a la superficie celular desde donde actúan sobre los linfocitos T auxiliares, esto provoca la liberación de citocinas, lo que resulta en una proliferación clonal de esos linfocitos ^(177, 178).

El complejo mayor de histocompatibilidad clase I se encuentra presente en casi todos los tipos celulares. Esas moléculas se unen a péptidos antigénicos de origen viral presentes en los compartimentos citoplasmáticos de la célula hospedera, que han sido anteriormente reconocidos por subclases de células T (células asesinas, citotóxicas, células CD8+) que producen una respuesta inmune por liberación de mediadores citotóxicos tales como

citocinas y proteasas, que destruyen al antígeno, y activan a los leucocitos. Esto puede traer como resultado un daño en el tejido periférico ^(179, 180).

La presencia del antígeno que no puede ser eliminado, origina una reacción crónica y local. La continua liberación de citocinas por parte de los linfocitos T sensibilizados da lugar a la acumulación de gran número de macrófagos, muchos de los cuales constituyen sucesivas capas de células epitelioideas. Así, los macrófagos que poseen antígenos en su superficie se convierten en blanco de células T asesinas y resultan destruidos. Otros mediadores celulares de la inflamación aparecen en la Tabla 2.

1.1.1.3. Resolución de la respuesta inflamatoria aguda

Un importante mecanismo de resolución y limitación de la respuesta inmune inflamatoria está mediado por la muerte celular de las células que inducen la inflamación. Este tipo de muerte celular es fundamentalmente de tipo apoptótico. La apoptosis inducida en neutrófilos puede limitar el número de células activadas productoras de mediadores proinflamatorios ⁽¹⁸¹⁾.

Gracias al proceso de resolución la respuesta inflamatoria termina con la reparación del tejido y la angiogénesis ⁽¹⁸²⁾. En este proceso hay tres pasos importantes: en el primero de ellos los neutrófilos y macrófagos llevan a cabo la eliminación de todo el material de desecho generado en el foco inflamatorio (paredes bacterianas, restos de células, etc.). Posteriormente hay una activación de fibroblastos que desencadena la regeneración del tejido dañado (división y reconstrucción); y por último se produce el proceso de angiogénesis, por el cual se revasculariza todo el tejido dañado ⁽¹⁸³⁾. Estos eventos se promueven por la acción de mediadores solubles que incluyen el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores transformadores del crecimiento, eicosanoides como la 12-lipoxigenasa, entre otros ^(184, 185, 186).

1.1.2. Inflamación crónica

A diferencia de la inflamación aguda, caracterizada por la infiltración mayoritaria de neutrófilos, en la inflamación crónica predominan los infiltrados de macrófagos y linfocitos ⁽¹⁸⁷⁾. Esta última se caracteriza también por el crecimiento de fibroblastos y tejido vascularizado que da lugar a tejido de cicatrización típico de los lugares anatómicos en los que ocurren inflamaciones de repetición. Este tipo de hipersensibilidad celular se ha demostrado en la tuberculosis, ciertos tipos de dermatitis por contacto, etc. ⁽¹⁾. Una de las secuelas más típicas de las inflamaciones crónicas es la formación de granulomas que son cúmulos de células inflamatorias, principalmente macrófagos y linfocitos rodeados de una pared fibrótica, que se forman en los tejidos en respuesta a un daño persistente. El núcleo de los granulomas está constituido por macrófagos activados, rodeados fundamentalmente por células epitelioides y por células multinucleadas resultantes de la fusión de macrófagos con células epiteliales. Este núcleo está rodeado por células T, cuya función en los procesos de inflamación crónica es crucial ^(14, 188, 189).

Además de la enfermedad granulomatosa, existen otras enfermedades crónicas que cursan con inflamación. Uno de los casos más representativos es la artritis reumatoide. En esta, la inflamación puede ser un efecto secundario provocado por una hiperactivación del sistema inmune, que amplifica la magnitud y gravedad de esta enfermedad. Los hipotéticos mecanismos de mimetismo molecular tras una infección por virus o bacterias y los del desenmascaramiento de antígenos propios secuestrados, pueden ser la causa del inicio de este tipo de enfermedades crónicas que cursan con inflamación y donde la activación de linfocitos T puede ser la clave de la patogenia ^(178, 190, 191).

1.1.4. Modulación farmacológica de los procesos inflamatorios

Como se ha expresado anteriormente, la inflamación es un proceso multicausal y multifactorial, por lo que el estudio de los agentes capaces de inhibir este fenómeno, ha llevado al desarrollo de drogas que actúan a diferentes niveles.

Dentro de los fármacos más utilizados en el tratamiento de los procesos inflamatorios se encuentran los antihistamínicos, antagonistas más o menos selectivos e inhibidores reversibles de la interacción de la histamina con sus receptores H₁. Estos agentes son bastante efectivos en las etapas tempranas de la inflamación, inhiben la mayoría de las respuestas del músculo liso a la histamina, así como el aumento de la permeabilidad capilar y la formación del edema. Sin embargo, en etapas más avanzadas del proceso inflamatorio, su efecto es bastante reducido y su empleo muy limitado. Otro aspecto en su contra radica en los efectos colaterales como la sedación, propiedad que poseen la mayoría de estos compuestos ⁽¹⁹²⁾.

Los esteroides constituyen otro grupo muy importante, ya que inhiben de manera eficaz la inflamación cualquiera sea la causa, en un tiempo relativamente breve, y actúan a través de la inducción de la síntesis de proteínas, como las lipocortinas, que a su vez, inhiben la actividad de la FLA₂, por lo que se impide la liberación de los mediadores proinflamatorios lipídicos. Se conoce que también son capaces de inhibir la COX-2, y la ONSi por activación de receptores glucocorticoides citoplasmáticos los cuales pueden regular la transcripción de dichas enzimas. También se ha señalado que pueden inhibir la síntesis de citocinas (por ejemplo FNT e IL-1) así como la expresión de sus receptores. Estos agentes desempeñan un papel importante como anti-inflamatorios, por la capacidad que tienen para inhibir el reclutamiento de leucocitos y monocitos-macrófagos así como la producción, por parte de las citocinas, de sustancias quimiotácticas y otros factores que intervienen en una mayor permeabilidad vascular, vasodilatación y contracción de diversos músculos lisos en

las áreas afectadas ^(193, 194). También se ha descrito que esta familia de compuestos estimulan la síntesis del inhibidor del factor de transcripción nuclear NF- κ B ⁽¹⁹⁵⁾. El primer mecanismo consiste en la capacidad de estos compuestos de inducir la expresión de I κ B α , para aumentar la retención citosólica de NF- κ B. Sin embargo, otros mecanismos involucran la represión de la ruta NF- κ B mediada por los glucocorticoides. Por ejemplo, la dexametasona puede reprimir la expresión de IL-6 y la transactivación dependiente de p65 en fibroblastos endoteliales de ratón, sin variar los niveles de las proteínas I κ B o la actividad de NF- κ B de unión al ADN ⁽¹⁶⁾. No obstante sus efectos anti-inflamatorios potentes, estos compuestos presentan numerosos efectos tóxicos. Por ejemplo, insuficiencias renales agudas, síndromes similares a la reactivación de artritis reumatoide y fenómenos de rebote de la enfermedad con recrudecimiento de su intensidad. El uso continuado también genera hipertensión arterial, hiperglucemia y glicosuria, cataratas, úlcera péptica, alteraciones de la conducta, obesidad, etc. ⁽¹⁷⁾

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, constituyen un tercer grupo, cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición reversible o irreversible de la actividad de las enzimas COXs en el metabolismo del ácido araquidónico, lo que les permite ejercer un buen efecto anti-inflamatorio, aunque no sea modificada la vía de las LOXs y se desvíe el metabolismo del ácido araquidónico hacia la producción de LTs ⁽¹⁸⁾. En la actualidad se desarrollan nuevos medicamentos inhibidores selectivos de la COX-2, (tanto de su actividad como de su expresión génica) que supuestamente no afectan por tanto las funciones fisiológicas de la enzima constitutiva y poseen una buena actividad anti-inflamatoria, sin causar la alta incidencia de efectos adversos propios de los inhibidores no selectivos. No obstante, las excelentes expectativas que se tenían al inicio de su descubrimiento han ido disminuyendo ya que estudios recientes sugieren que, en

comparación con otros anti-inflamatorios no esteroideos, prescritos a altas dosis y en las condiciones de ensayos clínicos en pacientes seleccionados, celecoxib y rofecoxib reducen modestamente la incidencia de efectos adversos gastrointestinales graves, por lo que no están desprovistos de estos riesgos. Persisten las dudas sobre otros tipos de efectos adversos como los renales y los cardíacos. La experiencia clínica en los primeros años de uso de celecoxib y rofecoxib en diversos países confirma que los anti-inflamatorios no esteroideos inhibidores de COX-2 están contraindicados en pacientes con úlcera péptica activa o hemorragia gastrointestinal, insuficiencia cardíaca o hepática grave, o con insuficiencia renal crónica. También plantean la posibilidad de que incrementen el riesgo de infarto miocárdico y de otros cuadros cardiovasculares en pacientes con antecedente o con factores de riesgo de cardiopatía isquémica ^(19, 196, 197, 198).

Como los LTs juegan un papel tan importante en la inflamación, el estudio de nuevas drogas que actúen como antagonistas de los receptores de los LTs o como inhibidores enzimáticos de la 5-LOX directamente, o de la actividad de la proteína activadora de la LOX, ha tenido un gran impulso obteniéndose algunos resultados prometedores en el tratamiento del asma ^(20, 21, 22).

Los diferentes metabolitos de los endoperóxidos de las PGs producen efectos biológicos opuestos y en la actualidad se estudian compuestos que inhiban de forma preferencial una u otra de las enzimas que isomerizan los endoperóxidos, por ejemplo la tromboxano sintetasa, lo que conlleva la inhibición de la agregación plaquetaria ⁽¹⁸⁾.

Recientemente, se ha centrado la atención en el desarrollo de sustancias que actúen sobre los mediadores inflamatorios de amplio espectro como IL-1, IL-6 y FNT α . Debido a la relación existente entre estas citocinas, el bloqueo de una o de todas puede conducir a potentes acciones anti-inflamatorias. A estos agentes se les ha denominado agentes anti-inflamatorios no esteroideos no convencionales. La estrategia que se ha seguido ha sido la

de encontrar sustancias que actúen sobre las citocinas y que bloqueen su liberación, inhiban las enzimas que participan en su síntesis, o antagonicen sus receptores, o sustancias que eleven los niveles de adenosina en los sitios de inflamación, ya que esta molécula puede ocupar receptores específicos e inhibir la acumulación de leucocitos en el sitio de inflamación por inhibición de la interacción entre las células mediadas por selectinas e integrinas, y de la producción de citocinas como el FNT. Otra vía para lograr estos resultados es la obtención de inhibidores de la ONSi ^(9, 199, 200).

Por otra parte, se conoce que las sustancias antioxidantes son capaces de suprimir o prevenir los procesos inflamatorios mediante inducción o prolongación de la vida media de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, el secuestro de las especies reactivas de oxígeno involucradas en este, o por quelación de metales que pueden estar involucrados en reacciones de oxidación-reducción, hechos que en su conjunto limitan la producción de especies reactivas del oxígeno ⁽²³⁾.

También se encuentran en estudio fármacos que actúan por diferentes mecanismos: reducción la disponibilidad de los iones calcio, que actúan en numerosas etapas de la respuesta inflamatoria, o que inhiben las fosfolipasas de manera diferente a los glucocorticoides. Además, se investiga en el campo de la inhibición de la formación de los componentes del complemento ⁽¹⁸⁾.

Existen otros productos anti-inflamatorios, que actúan por desviación del metabolismo de las enzimas involucradas en las respuestas inflamatorias y producen compuestos sin actividad biológica o con propiedades anti-inflamatorias ⁽¹⁸⁾ y aquellos que modulan factores transcripcionales clave en la inducción de genes proinflamatorios ^(25, 201).

El tratamiento con inhibidores de NF-κB específico de células T decrecen significativamente la severidad de la artritis en un modelo de artritis inducida por colágeno

en ratones ^(175, 190). Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la actividad de IKK β aminora marcadamente la artritis inducida por adyuvante ⁽²⁰²⁾.

Las enfermedades inflamatorias de las vías aéreas en humanos han sido asociadas con la expresión de moléculas de adhesión y citocinas. Se encontró que hay activación de NF- κ B en células epiteliales aéreas de pacientes asmáticos en las que existe una abundante expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, ONSi y COX-2 ⁽²⁰³⁾.

La gastritis asociada a Helicobacter pylori también está marcada por un incremento en la actividad de NF- κ B en células epiteliales gástricas ⁽²⁰⁴⁾.

Existen evidencias de la activación de NF- κ B en la enfermedad inflamatoria intestinal en la que los macrófagos de la lamina propria activan p50, c-Rel, y sobre todo p65 ⁽²⁰⁵⁾. También las enfermedades neurológicas ⁽²⁰⁶⁾ y la inflamación asociada a la arteriosclerosis están mediadas, en parte, por NF- κ B ⁽²⁰⁷⁾.

Algunos de los efectos de los corticoesteroides, utilizados en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, asma, psoriasis y artritis reumatoide están probablemente mediados por la inhibición de la activación de NF- κ B. Otros ejemplos de pequeñas moléculas incluyen sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, aspirina y otros fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y leflunomida. Sulfasalazina y leflunomida bloquean la translocación nuclear de NF- κ B por inhibición de la degradación de I κ B α . Esta acción podría ser debida a un efecto directo sobre IKK ⁽²⁵⁾.

Dentro de los inhibidores de NF- κ B han cobrado especial relevancia los productos naturales ⁽²⁵⁾. Los primeros derivados de plantas moduladores de NF- κ B fueron estudiados en la década pasada y lo constituyeron el salicilato de sodio y su derivado semi-sintético, la aspirina ⁽²⁰⁸⁾. Recientemente, han sido investigados otros derivados de plantas dentro de los cuales se encuentran: diterpenoides ^(209, 210, 211, 212), lactonas sesquiterpénicas ^(213, 214, 215),

triterpenoides ^(216, 217), glicósidos ⁽²¹⁸⁾, polifenoles ^(219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232), entre otros derivados y extractos de plantas ^(233, 234, 235, 236, 237, 238, 239).

1.2. Mangifera indica L.

Mangifera indica L., familia Anacardiaceae, es natural de la región indomalaya. Actualmente se cultiva en regiones tropicales y subtropicales. Los árboles de esta especie se caracterizan por alcanzar hasta 20 m de altura, con el tronco de 2,5 m de diámetro. Sus hojas son alternas, pecioladas, enteras, subcoreáceas, de 15 a 25 cm de longitud, generalmente lanceoladas. Las flores son pequeñas, agrupadas en grandes panículas terminales con 4 ó 5 pétalos imbricados. Fruto drupáceo, monospermo, de forma, tamaño y color variable según el cultivo. La pulpa es suave, jugosa y su semilla es aplanada, florece entre noviembre y febrero. Fructifica casi siempre entre mayo y junio. Alcanza la capacidad productiva después de los seis años y puede extenderse por más de 50 años. Mangifera indica se introdujo en Cuba en 1782 y se cultiva extensamente en toda la Isla, aunque a veces se escapa del cultivo ⁽²⁴⁰⁾.

1.2.1. Usos tradicionales

Existe un conocimiento documentado de la utilización de diferentes partes del árbol Mangifera indica L. (raíces, tallos, corteza, flores y frutos) para su empleo en el tratamiento de patologías tales como: menorragia ⁽²⁴¹⁾, escabiosis ⁽²⁴²⁾, diarreas ⁽²⁴³⁾, sífilis ⁽²⁴²⁾, amebas ⁽²⁴⁴⁾ e infecciones cutáneas ⁽²⁴⁵⁾. El empleo de extractos de Mangifera indica L. (hojas y tallo) ha sido descrito en la medicina tradicional como analgésico para el tratamiento de dolores dentales ^(245, 246) y musculares ^(243, 245), afecciones inflamatorias ^(242, 246, 247) y anemia ⁽²⁴³⁾. Los reportes conocidos sobre la utilización de extractos de diferentes partes del árbol de Mangifera indica L. muestran varios tipos de actividades biológicas, tales como insecticida, anti-giardiasico ⁽²⁴⁸⁾, antimalárico, antipirético ⁽²⁴⁹⁾, espasmolítico ⁽²⁵⁰⁾, antidiabético ⁽²⁵¹⁾ e inmunomodulador ⁽²⁵²⁾, pero no se conocen antecedentes sobre

estudios controlados que permitan correlacionar estos hallazgos con resultados clínicos en humanos. Existe conocimiento etnomédico documentado de varios países ⁽²⁸⁾ y, en particular, de la experiencia acumulada durante más de 20 años en la población cubana ^(26, 27).

1.2.2. Extracto acuoso de la corteza de Mangifera indica L.

El Centro de Química Farmacéutica (CQF) ha desarrollado un nuevo producto obtenido a partir de la experiencia en el uso etnomédico en Cuba del extracto acuoso de la corteza de Mangifera indica L. y que se comercializa bajo la Marca Registrada VIMANG.

En el análisis fitoquímico realizado a este extracto se ha comprobado la presencia de nueve compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido 3,4 dihidroxibenzoico, ácido benzoico, ácido gálico metiléster, ácido gálico propiléster, mangiferina (componente mayoritario), (+)-catequina, (-)-epicatequina y ácido benzoico propiléster. También se determinaron azúcares libres, ácidos grasos, polioles y microelementos como Cu, Zn y Se (ver Tabla 3) ^(29, 30).

En experimentos realizados para demostrar la capacidad antioxidante del extracto se pudo comprobar que este presentaba un elevado poder antioxidante in vitro, con capacidad de secuestrar radicales libres, inhibir la peroxidación lipídica y proteger del daño oxidativo, además de no presentar efecto pro-oxidante sobre el ADN, bajo las condiciones experimentales determinadas ⁽³¹⁾.

El extracto demostró capacidad protectora contra el daño oxidativo inducido por productos pro-oxidantes en suero, hígado y cerebro, así como inhibición de la superproducción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos peritoneales de ratón, efectos superiores en todos los casos a los obtenidos con vitaminas C, E y β -caroteno ⁽³²⁾. El extracto de M. indica también inhibió la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos y mostró su

capacidad antioxidante frente a la oxidación estimulada por seroalbúmina bovina a muy bajas concentraciones ⁽³³⁾.

En experimentos realizados en Gerbils de Mongolia se pudo demostrar que el extracto de M. indica protegió del daño provocado por la isquemia-reperfusión (I-R) cerebral ⁽³⁴⁾. El tratamiento con el extracto de M. indica elevó la actividad antioxidante en cerebro y protegió a este contra la muerte neuronal.

Por otra parte, en un modelo murino de I-R hepática el pre-tratamiento con el extracto de M. indica protegió al hígado de las ratas frente a la lesión isquémica y preservó la integridad celular ⁽³⁵⁾.

En otra serie de experimentos, el extracto de M. indica también tuvo efectos inmunomodulador sobre la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de rata ⁽³⁶⁾ y antimutagénico contra el daño provocado por la bleomicina ⁽³⁷⁾.

Los ensayos toxicológicos realizados al extracto de M. indica demostraron que este no poseía efectos tóxicos por vía oral ni tópica, pero sí presentó toxicidad cuando fue administrado por vía intraperitoneal en ensayos de toxicidad aguda en roedores. El extracto, al ser administrado por dosis repetidas de 2 g/kg por vía oral en ratas, no tuvo efectos tóxicos cuando fue administrado tanto a 28, 90 como 180 días. Tampoco se demostraron efectos mutagénico, clastogénico ni teratogénico por acción de dicho extracto (253, 254, 255, 256).

Tabla 3. Principales componentes encontrados en el extracto estandarizado de la corteza de M. indica obtenido en el Centro de Química Farmacéutica ⁽²⁵⁷⁾.

	Componentes	Contenido (%)
Polifenoles (40 – 60 %)	Mangiferina	10 – 20
	(+) Catequina	7 – 10
	(-) Epicatequina	4 – 7
	Ácido gálico, propil éster	2 – 5
	Ácido gálico, metil éster	2 – 5
	Ácido benzoico, propil éster	2 – 5
	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1 – 3
	Ácido benzoico	1 – 2
	Ácido gálico	1 – 2
Terpenoides (10 – 20 %)	Ácido mangiferónico	10 – 15
	Beta-elemeno	2 – 5
	Alfa-guaieno	2 – 5
	Aromandreno	2 – 5
	Hinesol	1 – 3
	Cicloartanoles	1 – 3
	Ledol	1 – 2
	Taraxerol	1 – 2
Azúcares (3 – 6 %)	Galactosa	2 – 5
	Glucosa	1 – 3
	Arabinosa	1 – 3
Polialcoholes (2 – 5 %)	Sorbitol	2 – 4
	Mioinositol	1 – 2
	Xilitol	0,5 - 1
Ácidos grasos (1 – 5 %)	Mirístico	0,1 – 3,0
	Palmítico	0,3 – 0,4
	Linoleico	0,15 – 0,35
	Oleico	0,2 – 0,4
	Estearico	0,1 – 0,2
	Eicosatrienoico	0,1 – 0,3
Microelementos (1 – 3 %)	Potasio	0,8 – 1,0
	Calcio	0,2 – 0,4
	Magnesio	0,1 – 0,2
	Hierro	0,1 – 0,2
	Cobre	Menor de 0,01
	Zinc	Menor de 0,01
	Selenio	0,03 – 0,08

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción y obtención del material de ensayo

El extracto de la corteza del árbol M. indica fue suministrado por el Departamento de Tecnología del CQF. Este fue preparado por decocción durante una hora y posteriormente concentrado por evaporación y atomización para obtener un polvo fino de color carmelita que funde a 210–215 °C con descomposición. Este material constituye el ingrediente activo de las formulaciones VIMANG, cuya composición química (Tabla 3) fue caracterizada mediante cromatografía (planar, líquida y gaseosa), espectrometría de masa y espectroscopía UV/VIS ⁽²⁹⁾. Se adjuntó a la muestra, codificada como QF-808 (lote E-01), el informe No. de folio 583 en el cual el servicio analítico del CQF certificó la calidad de la muestra estudiada. El extracto se disolvió en agua destilada para los estudios farmacológicos y se administró en forma de suspensión oral. En los experimentos en los que se necesitó una máxima dilución se usó como vehículo DMSO hasta 0,5 %. Las disoluciones fueron estables durante 24 h (según informe de estabilidad, codificado como CQF2001RG-030-011-003-01, suministrado por el laboratorio de Química Analítica del CQF) por lo que las muestras se prepararon al momento de la administración.

La mangiferina (2-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetra-hidroxi-9H-xanten-9-ona) fue obtenida en el laboratorio de Química Analítica del CQF. Esta fue purificada del extracto estandarizado de la corteza del árbol de M. indica por extracción con metanol y su pureza (~90 %) fue comparada con un patrón (Sigma, St. Louis, EU) por métodos espectroscópicos ⁽²⁹⁾.

2.2. Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de M. indica

2.2.1. Modelos de inflamación en animales de experimentación

2.2.1.1. Animales y tratamientos

En los experimentos se utilizaron ratones OF₁ y Balb-c (machos, 22-30 g) y ratas Sprague Dawley (machos, 250-300 g) procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Habana, Cuba), adaptados durante siete días a las condiciones del laboratorio. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo alterno de luz y oscuridad cada 12 h, la temperatura estuvo controlada entre 25-27 °C y una dieta EMO 1001 establecida para los animales de laboratorio. Después del período de adaptación los animales se distribuyeron en los diferentes grupos de acuerdo a sus pesos corporales, el alimento les fue retirado 18 h antes de los tratamientos y se les suministró agua ad libitum. Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los comités internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio y de acuerdo con las regulaciones nacionales establecidas para la experimentación animal.

Las dosis utilizadas fueron escogidas de experimentos anteriores en los que el extracto de M. indica demostró poseer un efecto antioxidante potente entre 50 y 250 mg/kg de peso corporal en roedores^(31,32,33,34,35,257).

2.2.1.2. Modelo de edema plantar inducido por agentes irritantes (carragenano y LPS) en ratas

Este ensayo fue llevado a cabo como describieron Boughton-Smith y cols.⁽²⁵⁸⁾. Ratas machos Sprague-Dawley recibieron, por vía oral (5 mL/kg), agua, extracto de M. indica (50, 100 y 200 mg/kg), indometacina o dexametasona (3 mg/kg, Sigma, St. Louis, EU), durante tres meses antes de la inyección subplantar de carragenano (0,1 mL de una suspensión al 1 % en disolución salina 0,9 %) o LPS [100 µg/100 µL, extraído de Escherichia coli (serotipo 055:B5, Sigma, St. Louis, EU)], en la pata trasera derecha. En la

pata izquierda sólo recibieron el vehículo (100 µL). La reacción inflamatoria resultante fue monitoreada como una función del hinchamiento de la pata inyectada a través del desplazamiento de volumen en un pletismómetro (Ugo Basile, Italia) antes y 5 h después de la aplicación de carragenano y 1 h después de la inyección de LPS. Posteriormente, los animales fueron sacrificados bajo atmósfera de éter y las patas edematosas fueron cortadas al nivel de la rodilla para la determinación de FNT α en el exudado inflamatorio.

2.2.1.3. Modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones

Este estudio se realizó de acuerdo a lo descrito por Bertini y cols ⁽⁷³⁾. Ratones Balb-c fueron tratados por vía oral (10 mL/kg) con el extracto de M. indica (1, 10, 50, 100 y 200 mg/kg) una hora o durante una semana antes de la aplicación i.p de una disolución de lipopolisacárido (LPS; 0,125 mg/kg) extraído de Escherichia coli (serotipo 055:B5, Sigma, St. Louis, EU) disuelto en disolución salina (NaCl 0,9 %) estéril y apirogénica. Mangiferina (20 mg/kg, p.o) fue administrada durante una semana antes de la inyección del LPS. Como fármaco de referencia se utilizó dexametasona (3 mg/kg, p.o, Farmacologico Milanese s.p.a, Milán, Italia) una hora o durante siete días antes de la administración del LPS. Una hora después de la última aplicación de los productos en estudio se anestesiaron los animales en atmósfera de éter dietílico y se realizó la extracción de sangre por ruptura del plexo retro-orbital, con pipetas Pasteur estériles. La sangre se depositó en tubos de 1,5 mL estériles, para su posterior centrifugación a 5 000 rpm con la finalidad de separar el suero. Este se conservó a -20 °C, hasta el momento de la determinación del FNT α .

2.2.2. Modelos de evaluación anti-inflamatoria in vitro

2.2.2.1. Ensayo para la determinación de la actividad de la fosfolipasa A₂ (FLA₂) de secreción

El ensayo para la determinación de la FLA₂ de secreción fue realizado con [³H]oleato de membranas de Escherichia coli autoclaveado y marcado por modificación del método de Escrig y cols. ⁽²⁵⁹⁾. Las cepas de E. coli CECT 101 fueron donadas por el Prof. Uruburu (Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia, España) y sembradas en medio que contenía 1 % de triptona; 0,5 % de NaCl y 0,6 % de dihidrógeno ortofosfato de sodio; pH 5,0 y crecieron por 6-8 h a 37 °C con oxigenación en presencia de 5 µCi/mL ácido [³H]oleico (actividad específica 10 Ci/mmol; Du Pont, Madrid, España). Las bacterias fueron centrifugadas a 2550 g por 10 min, posteriormente las membranas fueron lavadas en disolución tampón (0,7 M de Tris-HCl; 10 mM de CaCl₂; 0,1 % de seroalbúmina bovina; pH 8,0) para remover el oleato no incorporado o enlazado. Después del lavado de las membranas, ellas fueron resuspendidas en disolución salina y autoclaveadas por 30-45 min bajo presión, lavadas y centrifugadas nuevamente y almacenadas a -20 °C hasta la posterior determinación. Al menos 95 % de la radioactividad fue incorporada dentro de los fosfolípidos. Para el ensayo de FLA₂, 10 µL de enzima sinovial humana recombinante (Zeneca Pharmaceuticals, Cheshire, RU) fue adicionada a tubos que contenían 2,5 µL de extracto de M. indica, mangiferina a las concentraciones ensayadas (0,01-100 µg/mL) o Petrosaspongiolide M (5 µM) como compuesto de referencia ⁽²⁶⁰⁾ y 250 µL de la disolución tampón (100 mM de Tris-HCl; 1 mM de CaCl₂; pH 7,5), la cual fue preincubada a 37 °C por 5 min. Posteriormente, 10 µL de membranas marcadas con oleato autoclaveado fueron adicionadas e incubadas por otros 15 min a 37°C. Los ensayos finalizaron por adición de 100 µL de seroalbúmina bovina al 0,25 % congelada (Sigma, St. Louis, EU) en disolución

salina a una concentración final de 0,07 % p/v, para reaccionar con el ácido ^3H -oleico liberado. La mezcla de ensayo fue entonces centrifugada a 2 500 g por 10 min a 4 °C, y se determinó la radioactividad en el sobrenadante por conteo en centelleo líquido en un equipo LKB (Suecia).

2.2.2.2. Producción de PGE₂ y LTB₄ en macrófagos activados

2.2.2.2.1. Viabilidad celular

Estudios preliminares de citotoxicidad fueron llevados a cabo para ensayar la correlación entre citotoxicidad y supresión de la liberación de eicosanoides del extracto. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma, St. Louis, EU) ⁽²⁶¹⁾. Las células RAW264.7 (8×10^5) fueron diluidas en medio de cultivo DMEM (Gibco, Paisley, Escocia) con 10 % suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS, Hyclone Lab. Inc., Logan, EU), se depositaron con micropipeta en una placa de 96 pozos (Costar, EU) e incubaron toda la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células fueron expuestas a varias concentraciones de ensayo por tres horas bajo las mismas condiciones de incubación. Una disolución de MTT disuelta en DSTF fue adicionada a los pozos a una concentración final de 1 mg/mL. Después de aspirar cuidadosamente el medio se adicionaron 100 µL de DMSO para diluir los cristales de formazán. Posteriormente, fue leída la absorbancia a 520 nm en cada pozo con un lector de microplacas (PR-521SUMA, Cuba). Los valores de las concentraciones no tóxicas máximas obtenidas (< 200 µg/mL) fueron usadas en la determinación de PGE₂ y LTB₄.

2.2.2.2.2. Determinación de PGE₂ y LTB₄ en macrófagos activados

La línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 fue suspendida en medio de cultivo DMEM (Gibco, Paisley, Escocia) suplementado con 10 % FCS (Hyclone Lab. Inc., Logan, EU), y sembrado en placas de 24 pozos (Costar, EU) a una concentración de 5×10^5 células/mL. Después de la adherencia a los pozos (24 h a 37 °C en una atmósfera de 5 %

CO₂, las células que no se adhirieron fueron lavadas) las células recibieron DMEM fresco (sin FCS). Estas células fueron pre-tratadas por una hora a 37 °C con el extracto, fármacos de referencia o el vehículo, y entonces estimuladas por más de cuatro horas por adición de ionóforo de calcio A23187 (concentración final 10⁻⁶ M, para la liberación de LTB₄; Sigma, St. Louis, EU) o 24 h con LPS-IFN γ (100 ng/mL y 10 U/mL, para la liberación de PGE₂), respectivamente ⁽²⁶²⁾. Los controles contenían solamente DMSO (nivel básico de la liberación de eicosanoides) o compuestos de referencia (inhibición total de la liberación de eicosanoides). El contenido de todos los pozos fue congelado a -20 °C hasta la posterior determinación por inmunoensayos enzimáticos (EIA) de PGE₂ (Amersham, EIA system code RPN 222) y LTB₄ (Amersham, EIA system code RPN 223) según las instrucciones del productor. Todos los valores obtenidos para las muestras se encontraron en la zona lineal de la curva estándar. Indometacina (Sigma, St. Louis, EU), inhibidor de PGE₂, y NDGA (Sigma, St. Louis, EU), inhibidor de LTB₄, fueron usados como fármacos de referencia.

2.2.2.3. Producción de FNT α y ON en macrófagos y microglia activados

2.2.2.3.1. Líneas celulares

- Línea celular RAW264.7 (macrófagos murinos), gentilmente donada por el Dr. Jean Claude Drapier (Laboratoire de Biochimie, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Francia). Estas células se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Paisley, Escocia) suplementado con 4,5 g/L de glucosa, penicilina G 100 U/mL, sulfato de estreptomicina 100 μ g/mL, glutamina 4 mM y suero bovino fetal (FCS) al 10 % ⁽²⁶³⁾. En los experimentos desarrollados, se empleó una concentración de 10⁵ células/mL.
- Línea celular de microglia murina (Clono N9) fue gentilmente donada por la Dra. Paola Ricciardi-Castagnoli (Centro di Citofarmacologia, CNR, Milán, Italia). Estas células

fueron obtenidas por inmortalización de células embrionarias cerebrales con el retrovirus 3RV y activación en ellas del oncogen v-myc⁽²⁶⁴⁾ y fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Seromed, Berlín, Alemania) suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL, sulfato de estreptomicina 100 µg/mL (Gibco, Paisley, Escocia), 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Hyclone Lab. Inc., Logan, EU) y bicarbonato de sodio 1,5 g/L; HEPES 12 mM (Farmitalia-Carlo Erba, Milán, Italia), según Delgado y cols.⁽²⁶⁵⁾.

- Línea celular de fibroblastos murinos L929 (Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, Milán, Italia). Esta se empleó en el bioensayo para determinar la concentración de FNT α en sobrenadante de células en cultivo y en suero de ratones. Estas células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Seromed, Berlín, Alemania), en iguales condiciones que las células de microglia N9, descritas anteriormente.

2.2.2.3.2. Activación de macrófagos RAW264.7 y microglia murina N9

Las líneas celulares utilizadas (macrófagos RAW264.7 y microglia murina N9) permanecieron en frascos de cultivo (75 cm²) en los medios de cultivo anteriormente descritos y en el momento de los experimentos se lavaron con 10 mL de DSTF a pH 7, y finalmente tripsinizadas por incubación durante cinco minutos con Tripsina-EDTA 0,025%, para obtener de esta forma la suspensión celular necesaria. Se ajustó la concentración a 10⁵ células/mL de medio de cultivo. Los diferentes experimentos se realizaron en placas de 96 pozos, de fondo plano (10⁴ células/pozo). Las células permanecieron 24 h en estas condiciones, para lograr la total adherencia de ellas, antes del desarrollo del ensayo.

El extracto de M. indica, mangiferina y los fármacos de referencia se utilizaron disueltos en DMSO al 4 % en DSTF (concentración final en el pozo 0,4 %). Las disoluciones de los

productos (1 a 200 µg/mL) fueron filtradas mediante filtros de 0,22 µm (Costar, EU). Para ambos tipos de células, se realizó una pre-incubación de una hora con los productos en estudio antes de activarlas con LPS (10 ng/mL; E. coli, serotipo 055:B5, Sigma, St. Louis, EU) e IFN γ murino (2 U/mL; Sigma, St. Louis, EU). El sobrenadante se extrajo 24 h después de adicionarle a las células LPS+IFN γ y se utilizó para determinar FNT α y nitritos totales. Los fármacos de referencia fueron dexametasona (1 mM) y L-NMMA (1 mM) para los ensayos de FNT α y ON, respectivamente.

En todos los casos se utilizaron concentraciones de M. indica y mangiferina no citotóxicas (< 200 µg/mL), a partir de un estudio previo de citotoxicidad que se realizó con cada línea celular y se determinó la viabilidad celular por incorporación de MTT. En todas las condiciones experimentales se trabajó con una viabilidad celular superior al 97 % ⁽²⁶⁵⁾.

2.2.2.3.3. Determinación del FNT α

El FNT α en todos los casos fue determinado mediante un ensayo de citotoxicidad con la línea celular L929 de fibroblastos murinos ⁽²⁶⁶⁾ en presencia de 50 µL de una disolución de actinomicina D (1 µg/mL; Sigma, St. Louis, EU) durante 24 h en incubadora de CO₂ 5%, a 37 °C y atmósfera húmeda. Se tomaron 100 µL de una suspensión celular de 10⁵ células/mL en placas de cultivo de 96 pozos, fondo plano en medio RPMI 1640 (Seromed, Berlín, Alemania). El sobrenadante de cultivo de células RAW264.7 y N9 y el patrón de referencia a las diluciones sucesivas para realizar la curva patrón, se añadieron a las células L929 por 18 h. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y con éste las células muertas por efecto de la citotoxicidad del FNT α . Las células vivas adheridas al fondo del pozo fueron teñidas con 200 µL de una disolución de violeta cristal 0,5 % en metanol:agua (1:4, vol/vol) con el objetivo de fijar y teñir las células adheridas a cada pozo. Después de cinco minutos de exposición al colorante, este fue eliminado y las células teñidas fueron

lavadas tres veces con agua para eliminar los residuos de violeta cristal. Las placas se secaron a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro de microplacas (PR-521SUMA, Cuba). Se empleó FNT α recombinante humano (BASF/Knoll Ludwigshafen, Alemania) como patrón de referencia (actividad específica 10^7 U/mg) que mostró linealidad en el rango de concentraciones comprendidas entre 0,005 y 50 ng/mL de FNT α . Los resultados se expresaron como pg/mL de FNT α en cada muestra ensayada.

En el ensayo del choque endotóxico experimental, la sangre fue extraída por ruptura del plexo retro-orbital, una hora después de administrado el LPS, tiempo que se corresponde en este modelo con lo mayores valores de concentración para dicha citocina en suero y los resultados se expresaron como ng/mL de FNT α en cada muestra ensayada.

Del mismo modo fue determinada esta citocina en tejidos de los animales a los que se les indujo el edema plantar por carragenano y LPS. Para ello, se sacrificaron los animales en atmósfera de éter y las patas edematosas fueron cortadas al nivel de la rodilla. Posteriormente, estas fueron suavemente seccionadas y colocadas en el fondo de tubos de centrifuga de polipropileno y centrifugadas (a 1800 g, a 4 °C, por 20 min) con el objetivo de lograr una muestra del exudado de la pata. Estas muestras fueron congeladas y mantenidas a -20 °C hasta la determinación del FNT α en el exudado plantar, de acuerdo con los trabajos realizados por Azab y cols ⁽²⁶⁷⁾.

2.2.2.3.3.1. Análisis por Northern blot para el FNT α

Ratones Balb-c fueron tratados con el extracto de M. indica (50, 100 y 200 mg/kg, p.o) una hora antes de la administración del LPS (0,125 mg/kg, i.p). Treinta minutos después de administrado el LPS, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los pulmones e hígados fueron extraídos para la determinación del ARNm del FNT α . El ARN

total fue extraído según las metodologías descritas por Delgado y cols. ⁽²⁶⁸⁾ y acorde a los protocolos tradicionales establecidos para tales determinaciones ⁽²⁶⁹⁾.

Se procedió a realizar electroforesis del ARN total en geles de agarosa al 1%/formaldehído 2,2 M (10 µg/línea). Posteriormente, se transfirió el ARN por capilaridad a membranas de nylon apropiadas (Hybond-N+, Amersham, RU). En dichas membranas se fijó el ARN por dos horas a altas temperaturas, previo a la prehibridización. El fragmento de ADNc que codifica para el FNTα ⁽²⁷⁰⁾ fue marcado con ³²P mediante el ensayo Ready-To-Go ADN Labeling Kit (Pharmacia, Uppsala, Suecia) antes de la hibridización de la membrana y posterior auto-radiografía.

Los filtros fueron posteriormente rehibridizados con el empleo del ADNc de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, EU), que fue utilizado como control interno.

2.2.2.3.4. Determinación de nitratos

El ON que se forma a partir de la reacción de la ONS experimenta una rápida oxidación a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Estas especies iónicas aparecen en sangre de forma estable y su cuantificación constituye una vía indirecta para determinar la formación de ON ⁽²⁷¹⁾. Una determinación efectiva de los productos oxidados del ON se logra a partir de la reducción enzimática de los nitratos a nitritos en las muestras ensayadas, esto permitió realizar la determinación uniforme de ambos productos al cuantificar los nitritos resultantes mediante la reacción de Griess ⁽²⁷²⁾.

Las muestras de suero y el sobrenadante de cultivo de células RAW264.7 y N9 se desproteinizaron antes de su utilización y se mezclaron con 159 µL de la muestra y 30 µL de ZnSO_4 al 30 %. Posteriormente, los nitratos fueron transformados en nitritos con el empleo de un preparado celular de Escherichia coli (cepa 25922) que tenía la enzima nitrato reductasa previamente inducida. En una placa de 96 pozos se depositaron 30 µL de

suero desproteínizado, 15 µL de la suspensión bacteriana y 15 µL de la disolución tampón de reacción (2,5 mL de HEPES 100 mM + 2,5 mL de formiato de amonio 300 mM en 10 mL de agua destilada). Seguidamente las muestras se incubaron a 37 °C durante 90 min. Posteriormente, se añadieron 60 µL de reactivo de Griess (naftiletilendiamina 0,1 %, sulfanilamida 1 % en ácido fosfórico 2,5 %). Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se realizó la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un lector de microplacas (PR-521SUMA, Cuba).

La concentración de nitritos en cada muestra fue determinada a partir de una curva patrón de nitrito de sodio que mostró linealidad en el rango de concentraciones entre 3 y 500 µM.

2.2.2.4. Determinación de la proliferación de linfocitos T

2.2.2.4.1. Aislamiento de células mononucleares periferales humanas (PBMC) y ensayos de proliferación de linfocitos T

Las PBMC, de donadores voluntarios adultos sanos, fueron aisladas por centrifugación de sangre venosa por gradientes de densidad Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, EU). Las células PBMC (10^5 células) fueron estimuladas con el superantígeno de la enterotoxina B de Staphylococcus aureus (SEB, 1 µg/mL; BD Pharmingen, San Diego, EU) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del extracto de M. indica y cultivadas por triplicado en placas de 96 pozos de fondo redondo (Costar, Cambrigde, EU) en 200 µL de medio RPMI completo (Boi-Whittaker, VerViers, Bélgica) a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células fueron cultivadas por tres días y en las últimas 12 h fueron pulsadas con 0,5 µCi de [³H]dThd/pozo. La radioactividad incorporada al ADN fue medida en un contador líquido de centelleo.

2.2.2.4.2. Análisis citofluorométrico del antígeno de superficie celular y el ciclo celular

Las células PBMC (10^6) fueron estimuladas con SEB (1 µg/mL) en placas de 24 pozos (Costar, Cambrigde, EU) en un volumen total de 2 mL de medio completo por 72 h y la

mitad de las células fue utilizada para el análisis del ciclo celular y la otra mitad para medir la expresión de la superficie celular de CD25. Para los estudios del ciclo celular las células fueron lavadas con DSTF, fijadas en etanol (70 %, 24 h a 4 °C), seguido por digestión (ARNasa-A, 50 U/mL) y teñidas con yoduro de propidio (20 µg/mL) y analizadas por citofluorometría. Fueron colectadas 10 mil eventos por muestra y determinados los porcentajes de células en las fases S y G2-M del ciclo celular. La frecuencia de células bajo cromatinolisis fue calculada por la determinación de la sub-fracción G₀G₁. La expresión de CD25 (cadena α de IL-1R) fue detectada por fluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal RPE-conjugado (clono ACT-1) (Dako, Glostrup, Dinamarca). La fluorescencia de la superficie celular fue medida en un Analizador EPIC XL (Coulter, Hialeah, EU).

2.2.2.5. Determinación de la transcripción nuclear dependiente del factor de transcripción nuclear NF-κB

2.2.2.5.1 Líneas celulares

Células Jurkat (ATCC, Rockville, EU) fueron mantenidas en crecimiento exponencial en medio de cultivo RPMI 1640 (Bio-Whittaker, VerViers, Bélgica) suplementado con 10 % FCS inactivado por calor, 2 mM L-glutamina, 1 mM HEPES y antibióticos (Gibco, Paisley, Escocia). El clono de la línea 5.1 (donado por el Dr. N. Israël, Institut Pasteur, Paris, Francia) es un clono derivado de células Jurkat transfectadas establemente con un plásmido que contiene el gen de luciferasa manejado por el promotor HIV-LTR y fue mantenido en medio completo RPMI. Las células HeLa-Tet-Luc corresponden a una línea celular establemente transfectada con los plásmidos pTet-On y pTRE2-luc, así como el plásmido pSV-Hyg que le confieren resistencia adicional a higromicina (Clontech, Palo Alto, EU). En este clono celular la transcripción del gen de luciferasa está controlado por rtTA inducido por doxiciclina. Estas células contienen el gen de luciferasa dependiente de

NF- κ B establemente integrado dentro del genoma ⁽²⁷³⁾. Las líneas celulares transfectadas establemente fueron mantenidas en presencia del antibiótico marcador de resistencia G418 (100 μ g/mL) para 5.1 y en presencia de G418 y higromicina (100 μ g/mL) para HeLa-Tet-Luc, en medio de cultivo DMEM (Bio-Whittaker, VerViers, Bélgica) suplementado como el medio RPMI 1640.

2.2.2.5.2. Ensayo de luciferasa

Para determinar la transcripción específica dependiente de NF- κ B, las células 5.1 o HeLa-Tet-Luc fueron preincubadas con el extracto de M. indica seguido por estimulación con FNT α (2 ng/mL; Sigma, St. Louis, EU) o doxiciclina (4 ng/mL; Sigma, St. Louis, EU) por seis horas. Después, las células fueron lisadas en 25 mM Tris fosfato pH 7,8; 8 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 % Triton X-100 y 7 % glicerol. La actividad luciferasa fue medida en un Autolumat LB 953 (EG&G Berthold, EU), según las instrucciones del *kit* de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, EU). La concentración de proteína fue medida por el método de Bradford (Bio-Rad, Richmond, EU). El precipitado obtenido con el tampón de lisis fue sustraído en cada valor experimental y la transactivación específica fue expresada como la inducción máxima. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces.

2.2.2.5.3. Western blots

Las células Jurkat (1×10^6 células/mL) fueron estimuladas con FNT α (2 ng/mL) en presencia o ausencia del extracto de M. indica por los períodos de tiempo indicados. Posteriormente las células fueron lavadas con DSTF y resuspendidas en 50 μ L de tampón de lisis (20 mM HEPES pH 8,0; 10 mM KCl; 0,15 mM EGTA; 0,15 mM EDTA; 0,5 mM Na₃VO₄; 5 mM NaFl; 1 mM DTT; 1 μ g/mL leupeptin; 0,5 μ g/mL apronitina y 1 mM PMSF) que contenía 0,5 % NP-40. Después de cinco minutos en hielo, las proteínas citoplasmáticas fueron obtenidas por centrifugación y la concentración de proteínas determinada por el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Richmond, EU). Las proteínas (30

µg/línea) fueron hervidas en tampón Laemmli por dos minutos y realizada la electroforesis en SDS-PAGE con el 10% de gel. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (0,5 A en 100 V; 4 °C) por una hora. Los "blots" fueron bloqueados con disolución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 0,1 % Tween 20 y 5 % de leche deshidratada desgrasada durante toda la noche a 4 °C, y la inmunodetección de proteínas específicas fue llevada a cabo con anticuerpos primarios: anti-IκBα (donado por R. T. Hay, St. Andrews, Escocia), anti-α-tubulina (Sigma, St. Louis, EU) y el uso de un sistema de electroquimioluminiscencia (Amersham, RU). Los ensayos fueron llevados a cabo como se describió previamente ⁽²⁷⁴⁾.

2.2.2.5.4. Aislamiento de extractos nucleares y ensayo de cambio de movilidad (EMSA)

Las células Jurkat fueron cultivadas a 2×10^6 /mL y estimuladas con FNTα (2 ng/mL) en medio completo como ha sido indicado en presencia o ausencia del extracto de M. indica. Las células fueron entonces lavadas dos veces con DSTF frío y resuspendidas en 100 µL del tampón A (20 mM HEPES pH 8,0; 10 mM KCl; 0,15 mM EGTA; 0,15 mM EDTA; 0,15 mM spermidine; 0,15 mM spermine; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF y 0,5 µg/mL de leupeptin, pepstatin y aprotinin) que contenía 0,25 % de NP-40. Después de la lisis a 4 °C durante cinco minutos fueron adicionados 20 µL del tampón restaurador de sucrosa (50 mM HEPES pH 7,0; 0,25 mM EDTA, 10 mM KCl y 70 % de sucrosa). Los lisados fueron centrifugados a 5 000 rpm en una centrífuga para eppendorf a 4 °C por cinco minutos y los precipitados resultantes fueron resuspendidos en 100 µL de tampón B (20 mM HEPES pH 8,0; 50 mM NaCl; 25 % glicerol; 0,15 mM EGTA; 0,25 mM EDTA; 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, y los inhibidores de proteasa señalados anteriormente) y centrifugados a 5 000 rpm a 4 °C por cinco minutos. Los núcleos fueron resuspendidos en 50 µL del tampón C

(el mismo que el tampón B excepto que la concentración de NaCl fue 400 mM). Después de la rotación a 4 °C por 30 min, los núcleos fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 min y las proteínas del núcleo fueron recobradas del sobrenadante. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad, Richmond, EU). Para el ensayo de EMSA, fue utilizado un oligonucleótido de doble hebra que contenía el sitio NF- κ B del promotor metalotionina (Promega, EU). La mezcla de reacción de enlace contenía 3 μ g de extracto nuclear; 0,5 μ g poly(dI-dC) (Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, EU); 20 mM HEPES pH 7,0; 70 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,01% NP-40; 100 μ g/mL seroalbúmina bovina; 4% Ficoll y 100 000 cpm de fragmentos de ADN "end-labeled" en un volumen total de 20 μ L. Después de 20 min de incubación a 4°C, a la mezcla se le realizó la electroforesis en un gel de poliacrilamida 6 % nativo que contenía 89 mM Tris-borate, 89 mM ácido bórico y 1 mM EDTA. Los geles fueron conectados a la electroforesis por 30 min a 225 V y posteriormente las muestras fueron cargadas por dos horas. Posteriormente, los geles fueron secados y expuestos a película XAR a -70 °C. El ensayo se realizó como fue descrito previamente ⁽²⁷⁵⁾.

2.3. Análisis estadístico

Para todos los datos obtenidos se verificó inicialmente el cumplimiento de homogeneidad de varianza mediante la prueba de Barttelet y se analizó la normalidad de las variables estudiadas. De acuerdo a estos resultados, se aplicaron diferentes pruebas de comparación de medias, paramétricas y no paramétricas que se señalan en cada caso.

Para comparar las medias de los datos obtenidos en cada ensayo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Cuando se obtuvieron diferencias intragrupos experimentales, de acuerdo al ANOVA, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis o la prueba de Dunnett's a posteriori. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico Statistics sobre Windows (Release 4.0, Statsoft, Inc. 1993).

Valores probabilísticos (p) inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Análisis de regresión fueron usados para calcular la dosis efectiva (DE₅₀), definida como la dosis de cada droga necesaria para producir el 50 % del efecto esperado. De la misma manera fue calculada la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para los experimentos in vitro. En todos los casos en que se calculó el % de Inhibición se hizo a través de la relación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (\text{media valores de la muestra} / \text{media valores controles}) \times 100$$

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

En estudios precedentes se comprobó que la administración oral y aguda del extracto de M. indica no ejercía una acción anti-inflamatoria dependiente de la dosis empleada en experimentos de inducción de edema plantar⁽²⁷⁶⁾. En este estudio, a pesar de los resultados obtenidos y referidos anteriormente, se logró demostrar que el extracto poseía actividad anti-inflamatoria, por lo que se consideró oportuna la necesidad de su evaluación en estos modelos clásicos de inflamación pero mediante la administración por dosis repetidas, con el objetivo de que al realizar cambios en el diseño experimental se lograra demostrar con mayor claridad la acción anti-inflamatoria en estudio, con su correspondiente efecto farmacológico dependiente de la dosis del extracto empleada.

3.1. Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de M. indica en modelos in vivo

3.1.1. Acción del extracto de M. indica sobre la inflamación inducida por carragenano y LPS en ratas

La aplicación intraplantar de carragenano en las patas derechas de los animales produjo una respuesta inflamatoria que fue inhibida por el extracto de M. indica cuando fue administrado en dosis repetidas durante tres meses. Se obtuvo un efecto dependiente de la dosis en que el coeficiente de correlación, dosis vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,926$, con una $DE_{50} = 137,6$ mg/kg. La inducción del edema plantar por LPS también fue inhibida de forma dependiente de la dosis utilizada del extracto de M. indica. En esta se obtuvo un coeficiente de correlación, dosis vs. porcentaje de inhibición, de $r^2=0,964$, con una $DE_{50}=132,7$ mg/kg. Indometacina y dexametasona (3 mg/kg), utilizados como fármacos de referencia, también inhibieron el edema en este modelo (Tabla 4).

3.1.1.1. Efecto del extracto de M. indica sobre la producción de FNT α en el exudado plantar del edema inducido por carragenano y LPS

Las aplicaciones intraplantares de LPS o carragenano produjeron una elevación de la producción de FNT α en el exudado plantar a una o cinco horas de inducido el edema, respectivamente. El pretratamiento de los animales con el extracto de M. indica (50, 100 y 200 mg/kg, administrado por vía oral durante tres meses y una hora antes de LPS y carragenano) y dexametasona (3 mg/kg, administrada de la misma forma) causaron una reducción significativa de la producción de FNT α (Tabla 5). El efecto del extracto fue dependiente de la dosis utilizada, en el cual se obtuvieron coeficientes de correlación, dosis vs. porcentaje de inhibición, de $r^2=0,985$ tanto para LPS como carragenano, con $DE_{50s}=121,0$ (en el modelo de LPS) y 154,7 mg/kg en el modelo de carragenano. Sin embargo, la indometacina (3 mg/kg, administrada durante tres meses y una hora antes de la inyección de carragenano) no atenuó significativamente la elevación de los niveles del FNT α .

3.1.2. Efecto del extracto de M. indica en un modelo de choque endotóxico inducido por LPS en ratones. Inhibición de la producción del FNT α y su transcripto primario

La administración i.p de LPS (0,125 mg/kg) a ratones Balb-c estimuló la producción del FNT α en cantidades apreciables (nanogramos) en el bioensayo utilizado.

El extracto de M. indica, administrado oralmente una hora antes del LPS, inhibió la producción del FNT α inducido por LPS en ratones (Fig. 1A). La inhibición observada fue dependiente de la dosis, en la cual se obtuvo un coeficiente de correlación, dosis vs. porcentaje de inhibición, de $r^2=0,985$, con una $DE_{50}=64,5$ mg/kg. De la misma manera, el extracto inhibió los niveles del FNT, de manera dependiente de la dosis, en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación, dosis vs. porcentaje de inhibición, de $r^2=0,972$, con

Tabla 4. Efecto del extracto de *M. indica*, administrado por vía oral durante 3 meses, sobre el edema plantar inducido por carragenano y LPS en ratas.

Tratamiento	Dosis	Edema inhibición (%)			
		Carragenano		LPS	
		Δ vol. (mL)	Inhibición (%)	Δ vol. (mL)	Inhibición (%)
Carragenano	1%	1,64 \pm 0,11 ^a	0	-	-
LPS	100 μ g	-	-	1,65 \pm 0,11 ^a	0
<i>M. indica</i>	50 mg/kg	1,47 \pm 0,15 ^a	10,4	1,38 \pm 0,14 ^a	15,6
	100 mg/kg	0,90 \pm 0,07 ^b	45,0	0,92 \pm 0,06 ^b	44,2
	200 mg/kg	0,48 \pm 0,06 ^c	70,7	0,45 \pm 0,06 ^c	72,6
Indometacina	3 mg/kg	0,37 \pm 0,04 ^c	77,7	-	-
Dexametasona	3 mg/kg	-	-	0,24 \pm 0,03 ^d	85,5

Cada grupo representa la media \pm e.e.m. de 8 animales que fueron inyectados en la aponeurosis derecha con una suspensión de carragenano al 1% o LPS (100 μ g), según se describe en "Materiales y métodos" una hora después de la administración p.o del extracto de *M. indica*, indometacina, dexametasona y agua destilada estéril. Una y cinco horas después de la inyección de LPS y carragenano, respectivamente; los edemas fueron medidos mediante desplazamiento de volumen de agua en un pletismómetro. Los valores son expresados como % de inhibición del edema de los animales tratados respecto a los del grupo control. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

Tabla 5. Efecto del extracto de *M. indica* (administrado por vía oral durante 3 meses) sobre los niveles de FNT α detectados en el edema plantar inducido por carragenano y LPS en ratas.

Tratamiento	Dosis	Carragenano		LPS	
		FNT α (pg/mL)	Inhibición (%)	FNT α (pg/mL)	Inhibición (%)
LPS	100 μ g/ 100 μ L	-	-	2 550 \pm 50 ^a	0
Carragenano	1%	2 305 \pm 44 ^a	0	-	-
<i>M. indica</i>	50 mg/kg	1952 \pm 25 ^b	15,3	2 006 \pm 30 ^b	27,1
	100 mg/kg	1465 \pm 20 ^c	36,4	1 325 \pm 21 ^c	47,0
	200 mg/kg	855 \pm 45 ^d	62,9	712 \pm 5 ^d	72,1
Dexametasona	3 mg/kg	-	-	532 \pm 2 ^d	79,1
Indometacina	3 mg/kg	2312 \pm 32 ^a	0	-	-

Cada grupo representa la media \pm e.e.m. de 6-8 animales que fueron inyectados en la aponeurosis derecha con una suspensión de carragenano al 1% o LPS (100 μ g), una hora después de la última administración p.o del extracto de *M. indica*, indometacina, dexametasona y agua destilada estéril, que se administraron durante tres meses. Una y cinco horas después de la inyección de LPS y carragenano, respectivamente; los edemas fueron medidos mediante desplazamiento de volumen de agua en un pletismómetro, los animales fueron sacrificados, las patas fueron amputadas y se procedió a determinar los niveles de FNT α en los exudados plantares, según se describe en "Materiales y métodos". Los valores son expresados como % de inhibición del edema de los animales tratados respecto a los del grupo control. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

una $DE_{50}=37,4$ mg/kg cuando este fue administrado p.o durante siete días previos a la administración de LPS. La mangiferina (20 mg/kg), una glucosilxantona aislada del extracto a la que se le ha reportado un efecto antioxidante importante ⁽³²⁾, también inhibió el FNT α en un 75,2 %, respecto al grupo control tratado con el vehículo (Fig. 1B). Es importante señalar que ni el extracto ni mangiferina por sí solos influyeron en la biosíntesis de esta citocina proinflamatoria. En ambos casos la dexametasona (3 mg/kg, p.o) también inhibió la producción de FNT α .

La Fig. 2A ilustra el efecto que produjo el extracto de M. indica sobre los niveles de expresión del transcripto primario del FNT α (ARNm) en el pulmón e hígados de ratones tratados con LPS. Como se observa en la Fig. 2B hubo una disminución progresiva en la intensidad de las bandas para el ARNm de esta citocina, en correspondencia con el aumento de la dosis utilizada del extracto. Se pudo apreciar una mayor inhibición (menor intensidad de la banda) cuando los animales fueron pre-tratados con el extracto a dosis de 100 y 200 mg/kg.

Para todos los grupos experimentales se apreció igual expresión de la G3PDH (sonda utilizada como control del experimento).

El extracto de M. indica (Mi: 1-200 mg/kg, p.o.) fue administrado a los animales una hora antes (Figura 1A) o durante siete días (Figure 1B) antes de la inyección de LPS (0,125 mg/kg, i.p.). El grupo control fue tratado p.o con agua destilada estéril (vehículo). Mangiferina (M, 20 mg/kg), fue administrada p.o siete días antes de la aplicación de LPS. Dexametasona (Dex, 3 mg/kg, p.o una hora o durante siete días antes del LPS) fue usado como fármaco de referencia. Cada grupo representa la media \pm e.e.m de 6 animales. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

3.2. Evaluación de las propiedades anti-inflamatorias del extracto de M. indica en modelos in vitro

3.2.1. Efecto del extracto de M. indica sobre la actividad de la FLA₂ de secreción

La Tabla 6 muestra el potente efecto inhibitorio ejercido por el extracto de M. indica sobre la actividad de la FLA₂ de secreción sinovial humana recombinante. Se obtuvo un efecto dependiente de la concentración, en que el coeficiente de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,959$ con una $CI_{50}=0,7$ $\mu\text{g/mL}$. Mangiferina (10 $\mu\text{g/mL}$) y petrosaspongiolide M (5 μM), usado este último como compuesto de referencia, también tuvieron una acción inhibitoria sobre esta enzima del 92,8 y 97,8 %, respectivamente.

3.2.2. Efecto del extracto de M. indica sobre la liberación de PGE₂ y LTB₄ en macrófagos activados

El extracto de M. indica, mangiferina, indometacina y NDGA no fueron citotóxicos a las concentraciones ensayadas (1 - 100 $\mu\text{g/mL}$).

Como se muestra en la Tabla 7, la adición de LPS-IFN γ e ionóforo de calcio A23187 a macrófagos RAW264.7 generó cantidades apreciables (nanogramos) de eicosanoides vía COX y LOX, respectivamente. Este efecto fue medido en términos de concentraciones de PGE₂ y LTB₄ a través de EIA. La confirmación de la validez de este sistema para la identificación de las dos vías del metabolismo del AA fue llevada a cabo con indometacina, un inhibidor de COX bien caracterizado (92,3 % de inhibición de PGE₂ a 100 μM) y NDGA, un conocido inhibidor de 5-LOX (97,4 % de inhibición de LTB₄ a 25 μM).

Los compuestos estudiados demostraron un efecto inhibitorio sobre la liberación de eicosanoides en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS-IFN γ y el ionóforo de calcio A23187. En el ensayo de liberación de PGE₂, hubo un efecto dependiente de la

concentración para el extracto de M. indica, en que el coeficiente de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,995$ con una $CI_{50}=64,1$ $\mu\text{g/mL}$. De la misma manera, en el ensayo de liberación de LTB_4 también hubo un efecto dependiente de la concentración, en que el coeficiente de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,974$, con una $CI_{50}=22,9$ $\mu\text{g/mL}$. Mangiferina (10 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (100 μM) y NDGA (25 μM), usados estos dos últimos como compuestos de referencia, también tuvieron una acción inhibitoria sobre estos eicosanoides.

3.2.3. Acción del extracto de M. indica y la mangiferina sobre la producción del FNT α y ON en macrófagos y microglia activados

El tratamiento de células RAW264.7 y microglia con LPS e $IFN\gamma$ incrementó la producción de NO_2^- (indicativo del ON formado) y FNT α a concentraciones aproximadamente de 10 hasta 1000 veces superiores respecto a los valores encontrados en células controles (sin estímulos).

La Fig. 3A muestra una marcada reducción sobre la producción del FNT α cuando los macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS e $IFN\gamma$ fueron pre-incubados con el extracto de M. indica con un efecto dependiente de la concentración, en que el coeficiente de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,983$, con una $CI_{50}=94,1$ $\mu\text{g/mL}$. El extracto también inhibió la producción de NO_2^- en esta línea celular con un efecto dependiente de la concentración, en que el coeficiente de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fue de $r^2=0,976$, con una $CI_{50}=69,4$ $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3B). Mangiferina, un antioxidante conocido y el componente mayoritario del extracto, inhibió la producción de FNT α y ON con un efecto dependiente de la concentración, en que los coeficientes de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fueron de $r^2=0,900$ para ambos mediadores, a CI_{50} s más altas que el extracto. En este caso, FNT α fue

bloqueado con una $CI_{50}=159,2 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 4A) y NO_2^- con una $CI_{50}=381,0 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 4B).

Las máximas inhibiciones sobre la producción de $\text{FNT}\alpha$ fueron 71,8 % (extracto de M. indica) y 53,8 % (mangiferina). Mientras que para la producción de NO_2^- fueron de 83,8 % (extracto de M. indica) y 33,8 % (mangiferina).

Por otra parte, el pre-tratamiento con el extracto de M. indica en microglia estimuladas con $\text{LPS}+\text{IFN}\gamma$ inhibió la producción de $\text{FNT}\alpha$ (Fig. 5A) y los NO_2^- totales, como medida del ON formado (Fig. 5B), con un efecto dependiente de la concentración, en que los coeficientes de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fueron de $r^2=0,976$ (para FNT) y 0,977 (para ON) y $CI_{50}\text{s}=76,0 \mu\text{g/mL}$ y $84,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

La Fig. 6 muestra el tratamiento de las células de microglia estimuladas con $\text{LPS}+\text{IFN}\gamma$ en presencia de mangiferina. Esta xantona también inhibió la producción de $\text{FNT}\alpha$ (Fig. 6A) y los NO_2^- totales (Fig. 6B) con efectos dependientes de las concentraciones utilizadas, en que los coeficientes de correlación, concentración vs. porcentaje de inhibición, fueron de $r^2=0,985$ (para FNT) y 0,970 (para NO) con $CI_{50}\text{s}=63,6 \mu\text{g/mL}$ y $78,8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Las máximas inhibiciones sobre la producción de $\text{FNT}\alpha$ fueron de 71,8 % (extracto de M. indica) y 63,6 % (mangiferina). Mientras que para la producción de NO_2^- fueron de 83,8 % (extracto de M. indica) y 78,8 % (mangiferina).

Dexametasona y L-NMMA, que fueron usados como compuestos de referencia, también mostraron efecto inhibitorio sobre la producción de $\text{FNT}\alpha$ y ON, respectivamente.

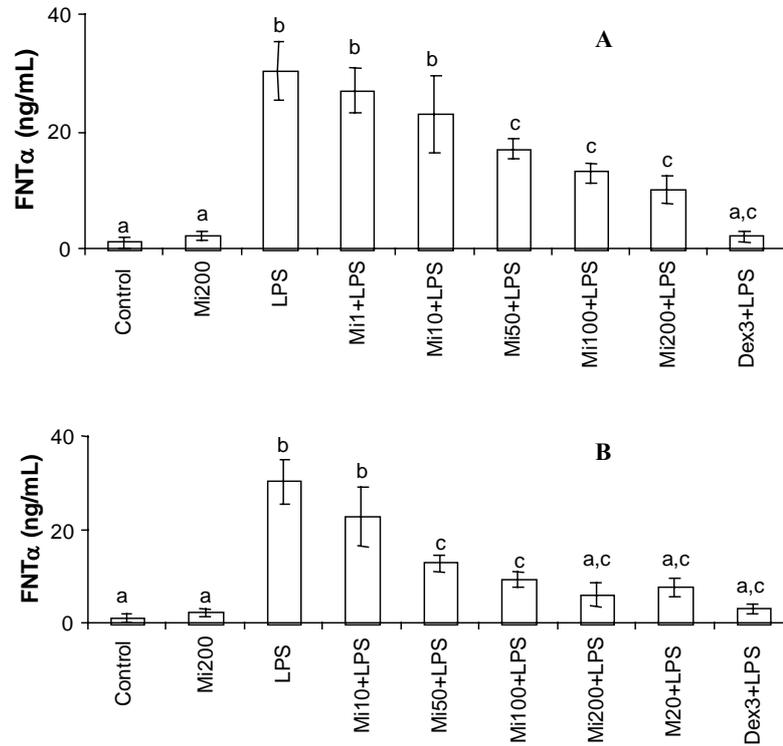


Figura 1. Efectos del extracto de *M. indica* y la mangiferina aislada sobre la producción de FNT α en suero de ratones inyectados con LPS.

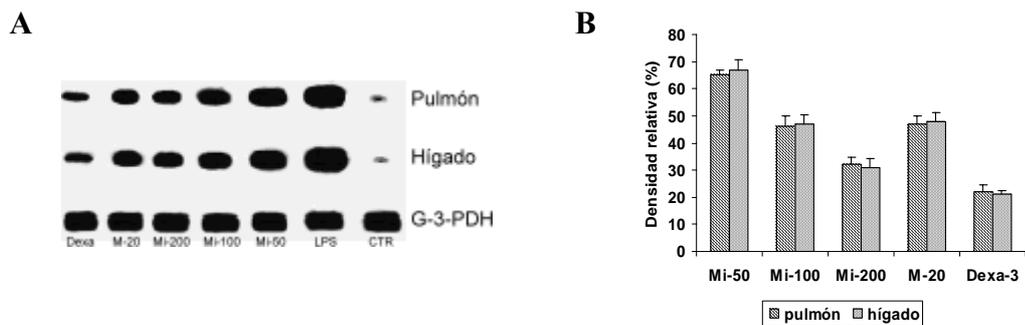


Figura 2. Análisis por Northern blot de la expresión del ARNm del FNT α en pulmones e hígados de ratones tratados con el extracto de *M. indica* y mangiferina y posterior aplicación de LPS.

A. Northern blot representativo del efecto del extracto de *M. indica* (Mi, 50, 100 y 200 mg/kg), mangiferina (M, 20 mg/kg) y dexametasona (Dexa, 3 mg/kg) sobre la expresión del transcrito primario del FNT α (ARNm) en pulmones e hígados de ratones Balb-c tratados con LPS (0,125 mg/kg). CTR- grupo control sin LPS. Los compuestos evaluados y el vehículo (grupo LPS) fueron administrados una hora antes del LPS. Los pulmones e hígados fueron extraídos 30 min después de administrado el LPS. Se empleó como sonda control la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). **B.** Densidades relativas (%) para cada banda respecto a los grupos tratados solo con LPS. Cada grupo representa la media \pm e.e.m de tres experimentos. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

Tabla 6. Efecto inhibitorio del extracto de *M. indica* y la mangiferina sobre la actividad de la FLA₂ de secreción.

	Concentración	FLA ₂ (x10 ³ c.p.m./mg proteína)	Inhibición (%)
Control	-	5,3 ± 0,4 ^a	0
<i>M. indica</i>	0,01 µg/mL	4,8 ± 0,2 ^a	14,5
	0,1 µg/mL	4,2 ± 0,2 ^b	27,2
	1 µg/mL	2,3 ± 0,1 ^c	76,1
	10 µg/mL	1,5 ± 0,1 ^d	96,5
	100 µg/mL	1,4 ± 0,1 ^d	97,6
Mangiferina	10 µg/mL	1,6 ± 0,1 ^d	92,8
P-M	5 µM	1,4 ± 0,1 ^d	97,8

La enzima fue pre-incubada con el extracto de *M. indica*, mangiferina, P-M (Petrosaspongiolide M) y el vehículo (control) por cinco minutos a 37 °C, y posteriormente se adicionó el sustrato y se incubó por otros 15 min, de acuerdo al procedimiento descrito en "Materiales y métodos". Los valores representan las medias ± e.e.m. (n=6). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre grupos.

Tabla 7. Efecto del extracto de *M. indica* sobre la biosíntesis de PGE₂ y LTB₄ en macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS+IFN γ y el ionóforo de calcio A23187.

	Concentración	PGE ₂ (ng/mL)	Inhibición (%)	LTB ₄ (ng/mL)	Inhibición (%)
LPS + IFN γ	100 ng/mL/ 10 U/mL	182,0 ± 10,3 ^a	0	-	-
A23187	10 ⁻⁶ M	-	-	40,0 ± 6,3 ^a	0
<i>M. indica</i>	10 µg/mL	175,0 ± 0,3 ^a	3,8	23,6 ± 5,3 ^b	41,0
	50 µg/mL	119,5 ± 8,6 ^b	34,3	12,7 ± 2,6 ^b	68,3
	100 µg/mL	30,6 ± 2,6 ^c	83,2	5,0 ± 2,6 ^c	87,5
Mangiferina	10 µg/mL	28,6 ± 3,5 ^c	84,3	12,5 ± 3,5 ^b	68,8
Indometacina	100 µM	14,1 ± 3,2 ^d	92,3	-	-
NDGA	25 µM	-	-	1,1 ± 0,4 ^c	97,4

Las células RAW264.7 fueron pre-tratadas por una hora a 37 °C con el extracto de *M. indica*, indometacina, NDGA y el vehículo (DMSO) y estimuladas por otras cuatro horas con el ionóforo de calcio A23187 (10⁻⁶ M) para la liberación de LTB₄ o 24 h con LPS (100 ng/mL) - IFN γ (10 U/mL) para la liberación de PGE₂, de acuerdo al procedimiento descrito en "Materiales y métodos". LTB₄ y PGE₂ fueron determinados por EIA. Los valores representan las medias ± e.e.m. (n=6). Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre grupos.

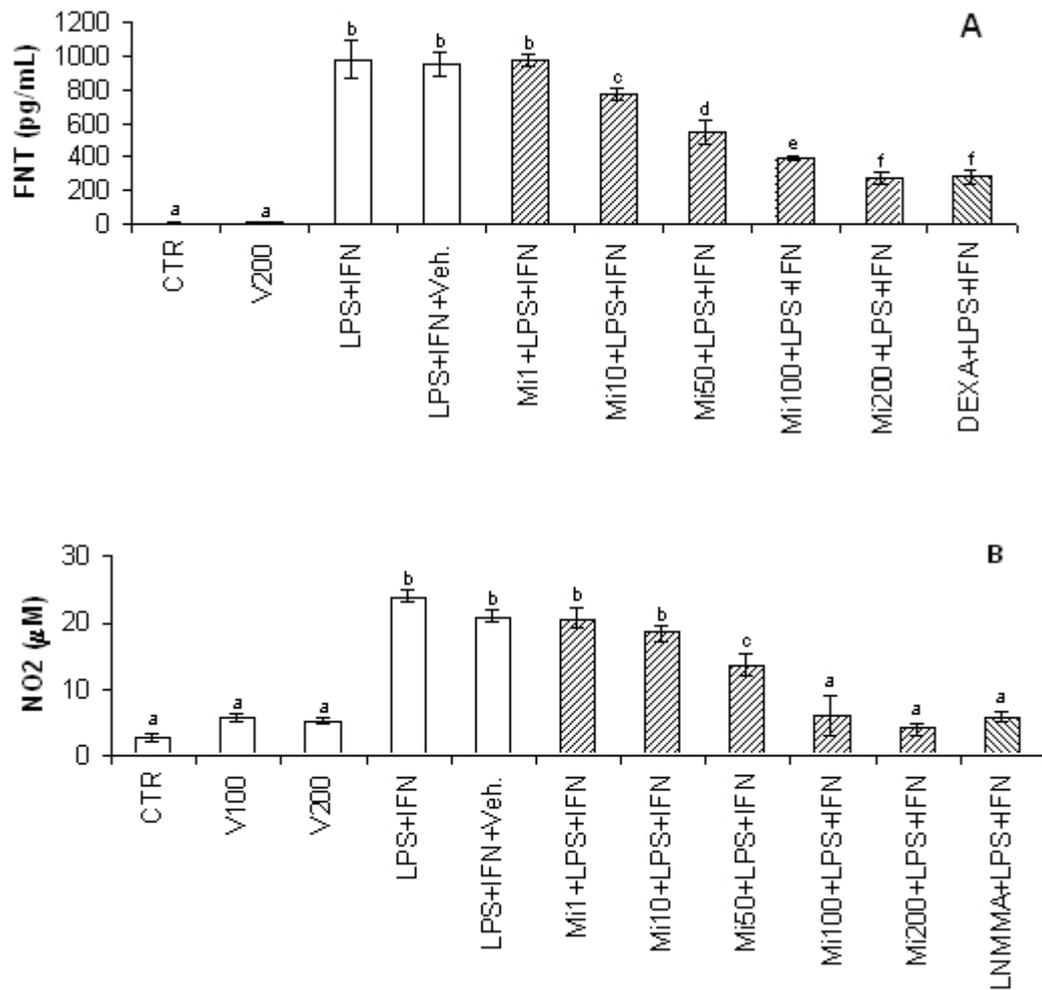


Figura 3. Efecto del extracto de *M. indica* (Mi) (concentración: 1, 10, 50, 100, 200 µg/mL) sobre la producción de FNTα (Figura 5A) y nitritos totales (Figura 5B) en células RAW264.7 (10^5 células/mL) activadas con LPS (10 ng/mL) e IFN γ (2 U/mL). La dexametasona (DEXA) 1mM y el N-monometil-L-Arginina (L-NMMA) 1 mM constituyeron los controles positivos de cada ensayo. En las figuras se expresan los valores de la media \pm e.e.m., para 3 experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Veh. (vehículo en que se disolvió el extracto de *M. indica*, DMSO 0,4%, concentración final en el pozo) en DSTF.

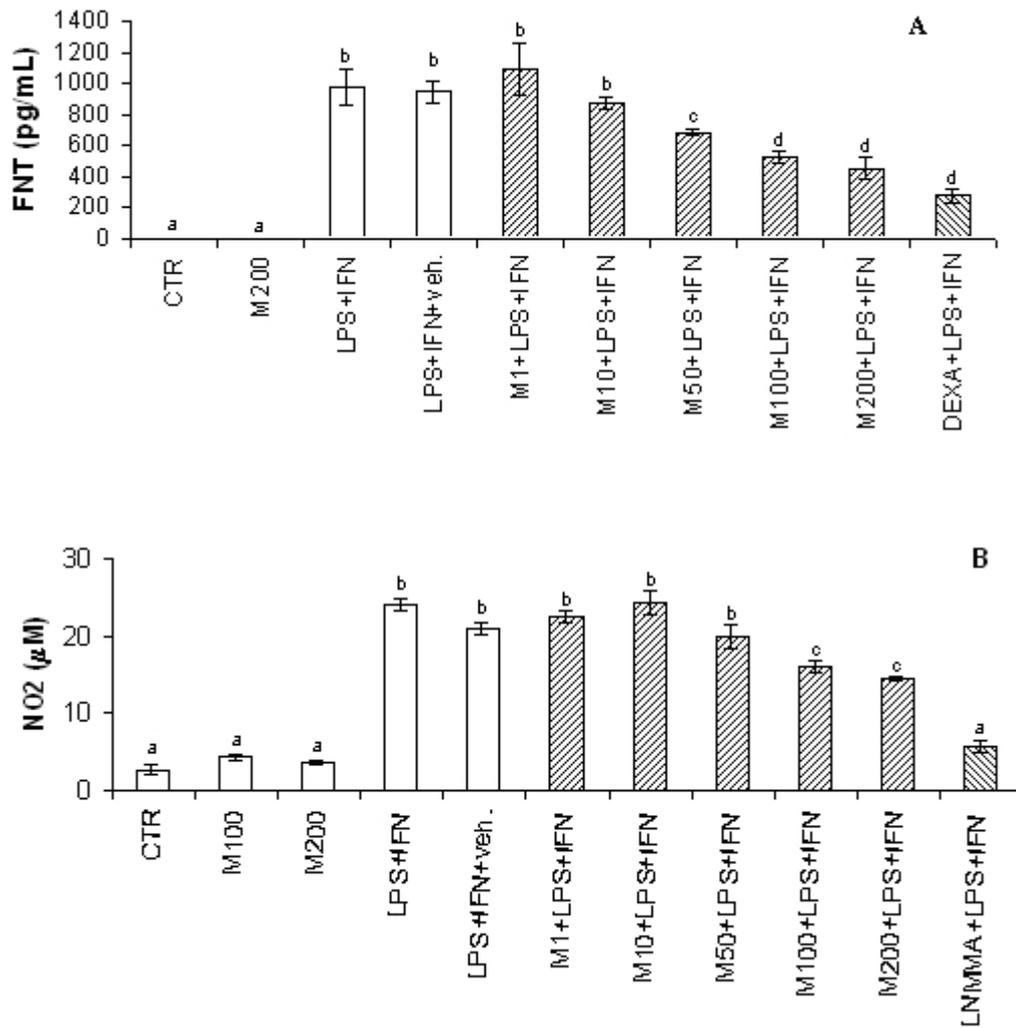


Figura 4. Efecto de la mangiferina (M) (concentración: 1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la producción de FNT α (Figura 6A) y nitritos totales (Figura 6B) en células RAW264.7 (10^5 células/mL) activadas con LPS (10 ng/mL) e IFN γ (2 U/mL). La dexametasona (DEXA) 1mM y el N-monometil-L-Arginina (L-NMMA) 1 mM constituyeron los controles positivos de cada ensayo. En las figuras se expresan los valores de la media \pm e.e.m., para tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Veh. (vehículo en que se disolvió la mangiferina, DMSO 0,4%, concentración final en el pozo) en DSTF.

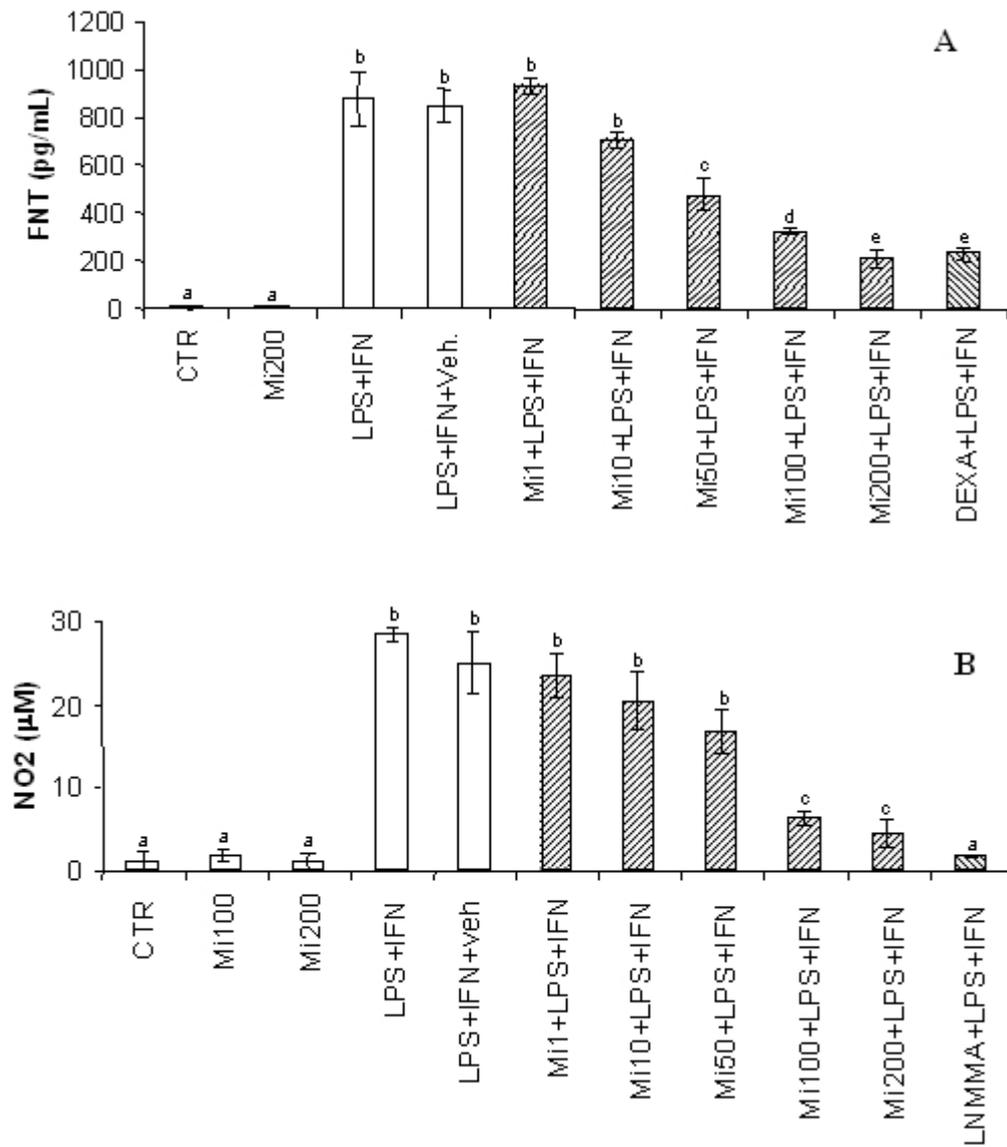


Figura 5. Efecto del extracto de *M. indica* (Mi) (concentración: 1, 10, 50, 100, 200 µg/mL) sobre la producción de FNTα (Figura 7A) y nitritos totales (Figura 7B) en células de microglia murina (N9) (10^5 células/mL) activadas con LPS (10 ng/mL) e IFN γ (2 U/mL). La dexametasona (DEXA) 1mM y el N-monometil-L-Arginina (L-NMMA) 1 mM constituyeron los controles positivos de cada ensayo. En las figuras se expresan los valores de la media \pm e.e.m., para tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Veh. (vehículo en que se disolvió el extracto de *M. indica*, DMSO 0,4%, concentración final en el pozo) en DSTF.

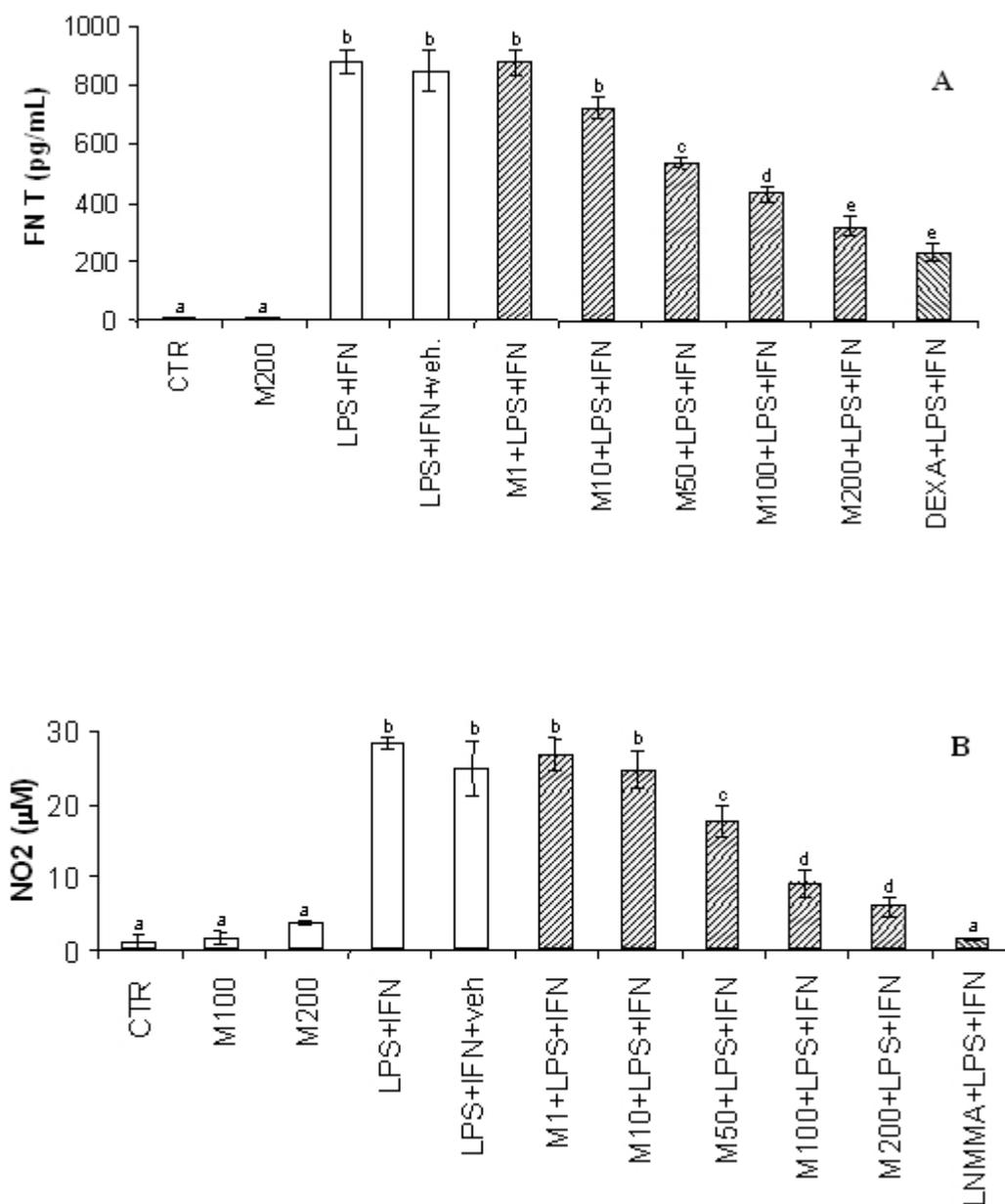


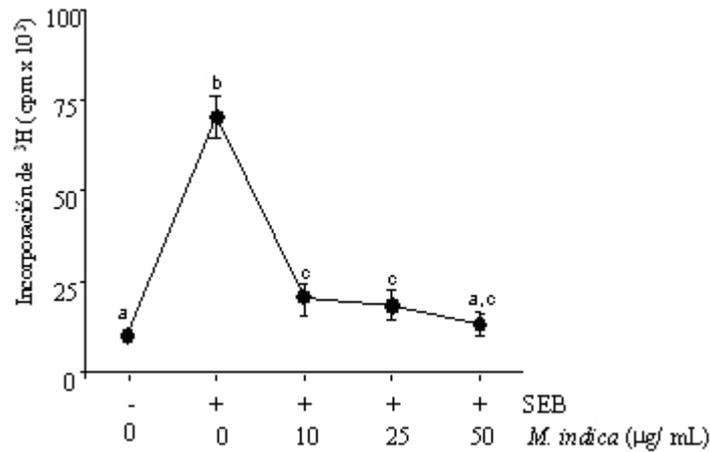
Figura 6. Efecto de la mangiferina (M) (concentración: 1, 10, 50, 100, 200 µg/mL) sobre la producción de FNTα (Figura 8A) y nitritos totales (Figura 8B) en células de microglia murina (N9) (10^5 células/mL) activadas con LPS (10 ng/mL) e IFN γ (2 U/mL). La dexametasona (DEXA) 1mM y el N-monometil-L-Arginina (L-NMMA) 1mM constituyeron los controles positivos de cada ensayo. En las figuras se expresan los valores de la media \pm e.e.m., para tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Veh. (vehículo en que se disolvió la mangiferina, DMSO 0,4%, concentración final en el pozo) en DSTF.

3.2.4. Efecto del extracto de M. indica sobre la proliferación de células T

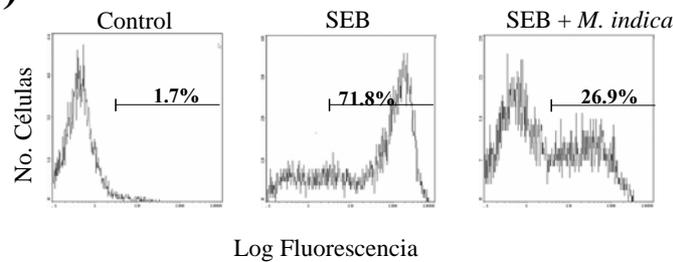
Ya que se ha reportado previamente que el extracto de M. indica ha ejercido algunas funciones biológicas en células del sistema inmune, ⁽³²⁾ en este trabajo se estudió el efecto de este extracto sobre varios eventos en la activación de linfocitos T. En la Fig. 7 se muestra que el tratamiento con el extracto inhibió completamente la proliferación celular mediada por el receptor de células T (TCR) e inducida por el superantígeno SEB en la que se obtuvo el 90% de inhibición con la dosis más baja probada (10 µg/mL, Fig. 7A).

Posteriormente, fue estudiado el efecto del extracto de M. indica sobre la expresión en la superficie celular de los marcadores de activación CD25 en células T primarias estimuladas con SEB. En la Fig. 7B se observa que el extracto, a concentración de 25 µg/mL, inhibió ampliamente la expresión en la superficie celular de este antígeno. Como consecuencia de la activación celular, las células T primarias progresan a las fases S y G₂-M del ciclo celular, y en este estudio se evaluó el efecto del extracto sobre la progresión del ciclo celular en estas células T estimuladas con SEB. El tratamiento con SEB (1 µg/mL) indujo la progresión del ciclo celular con aproximadamente un 22% de las células teñidas en las fases S o G₂-M, mientras que el extracto de M. indica (25 µg/mL) previno casi completamente la entrada de las células en la fase S del ciclo celular (Fig. 7C). Es importante destacar que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células hipodiploides (sub G₀-G₁) entre las células estimuladas con SEB y SEB más el extracto de M. indica. Estos resultados indican que a la dosis utilizada el extracto no es citotóxico o apoptótico en células T primarias.

A)



B)



C)

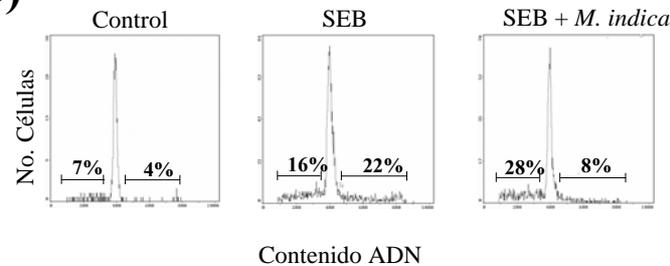


Figura 7. Efecto del extracto de *M. indica* sobre los eventos de activación de células T.

A. Los linfocitos T humanos purificados, estimulados con el superantígeno SEB (1 µg/mL) fueron pre-tratados con las concentraciones indicadas del extracto. Los resultados son expresados como media ± e.e.m. de tres experimentos. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. **B.** Efecto del extracto de *M. indica* sobre la expresión de la superficie celular, inducida por SEB, del marcador de activación CD25. Las células T humanas fueron pre-incubadas con el extracto (25 µg/mL) seguido por estimulación con SEB (1 µg/mL) e incubadas 72 h para obtener la expresión de CD25. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes. **C.** Efecto del extracto de *M. indica* sobre la progresión del ciclo celular. Los linfocitos T humanos purificados fueron estimulados con SEB (1 µg/mL) en presencia o no del extracto (25 µg/mL) durante 72 h. Se indica el porcentaje de células que entraron en las fases S y G₂-M del ciclo celular. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

3.2.5. Acción del extracto de M. indica sobre el factor de transcripción nuclear NF- κ B

3.2.5.1. Efecto del extracto de M. indica sobre la activación transcripcional de NF- κ B

Para explorar si el extracto de M. indica inhibía o no la actividad transcripcional dependiente de NF- κ B fue usado el clono de la línea celular 5.1 que contiene el gen de la luciferasa controlado por el promotor HIV-1-LTR, el cual es sensible a FNT α a través de la vía de NF- κ B.

Las células fueron pre-incubadas con concentraciones crecientes del extracto de M. indica y entonces estimuladas con FNT α por seis horas. Posteriormente, las células fueron lisadas y medida la actividad celular. Como se muestra en la Fig. 8A el extracto inhibió la transcripción del gen HIV-1-LTR dependiente de FNT α . Para evaluar si la actividad inhibitoria del extracto en la expresión de luciferasa era o no específica, se realizó una pre-incubación de células HeLa-Tet-Luc con las mismas concentraciones del extracto que se usaron en las células 5.1. Las células HeLa-Tet-Luc fueron estimuladas con doxiciclina por seis horas y fue medida la actividad transcripcional rtTA. En la Fig. 8B se observa que el extracto no afectó la expresión de luciferasa en este sistema celular de control.

3.2.5.2. Acción del extracto de M. indica sobre la degradación de I κ B α y el enlace del NF- κ B al ADN

Para identificar el blanco molecular de los efectos del extracto de M. indica sobre la vía de activación de NF- κ B, se estimularon células Jurkat con FNT α (2 ng/mL) a diferentes tiempos en presencia o ausencia del extracto (25 μ g/mL) y fueron analizadas las fracciones nuclear y citoplasmática para la actividad de enlace al ADN del NF- κ B por EMSA y para el estudio del estado estacionario de los niveles de I κ B α por Western blot, respectivamente.

Los experimentos de cinética revelaron un claro incremento en el enlace de NF- κ B al ADN después de 15 min de estimulación que se mantuvo durante el tiempo de estimulación, el

incremento en el enlace al ADN fue paralelo a la degradación de I κ B α que fue claro después de 15 min de estimulación con FNT α y recobrado después de 560 min de estimulación. Resulta interesante destacar que tanto el enlace al ADN del NF- κ B como la degradación de I κ B α fueron prevenidas por la presencia del extracto de M. indica, el cual no afectó los niveles del estado estacionario de α -tubulina (Fig. 9).

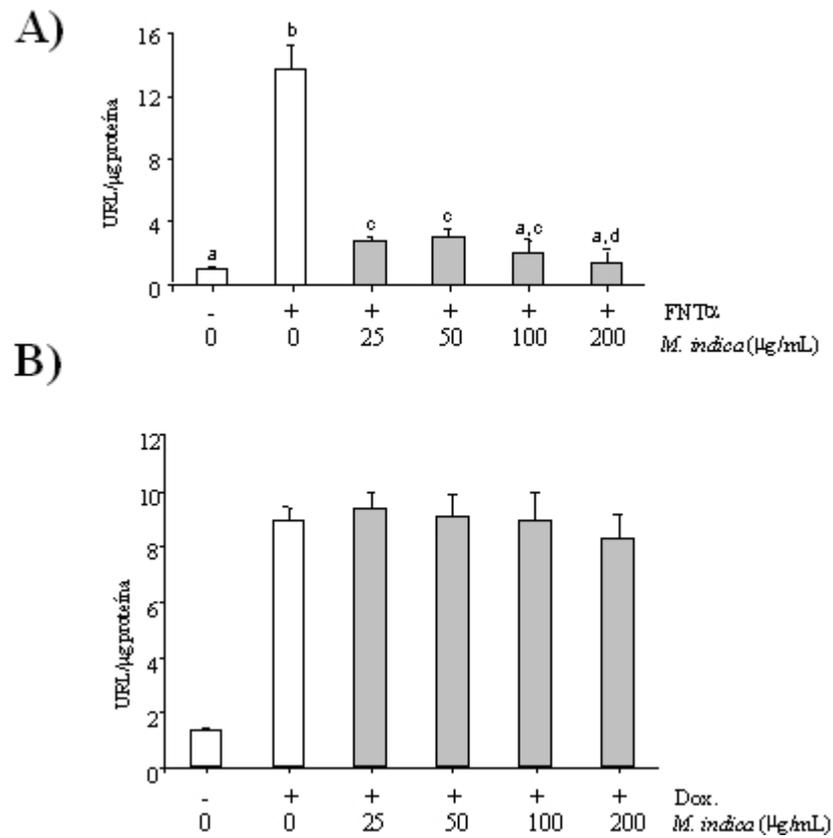


Figura 8. El extracto de *M. indica* es un inhibidor específico de la actividad transcripcional dependiente de NF-κB.

A. El extracto de *M. indica* inhibe la transactivación HIV-1-LTR en células 5.1. La actividad luciferasa fue medida y expresada como RLU/μg de proteína. Los valores son expresados como medias ± e.e.m. de cuatro experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. **B.** El extracto de *M. indica* no inhibió la transactivación del promotor rtTA inducido por doxiciclina (Dox) en células HeLa-Tet-Luc. Las células HeLa-Tet-Luc fueron pre-incubadas con las concentraciones indicadas del extracto antes de la estimulación con doxiciclina (4μg/mL). Los resultados representan las medias ± e.e.m. de tres experimentos diferentes.

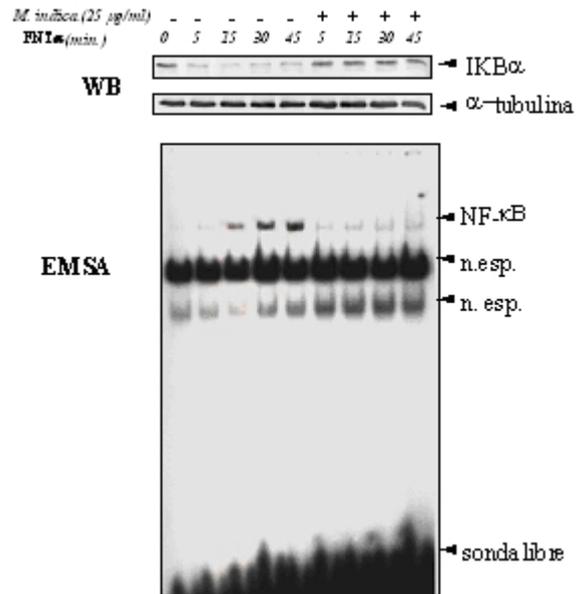


Figura 9. Efecto del extracto de *M. indica* sobre la unión del NF-κB al ADN y la degradación de IκBα en células Jurkat.

Las células Jurkat fueron incubadas con el extracto durante 30 min, tratadas con FNTα durante los tiempos indicados y entonces ensayados: el enlace de NF-κB, la degradación de IκBα y la expresión de α-tubulina. Los resultados son representativos de dos experimentos diferentes.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La reacción inflamatoria se caracteriza por constituir un proceso extremadamente complejo y multifactorial, por tanto, resulta importante, a la hora de estudiar los mecanismos involucrados en la acción anti-inflamatoria de un determinado producto, tener en cuenta este aspecto, para no realizar simplificaciones que conduzcan a una incorrecta interpretación del proceso.

Al tratar de caracterizar los mecanismos por los que un extracto natural, como el que es objeto de estudio en este trabajo, desarrolla acción anti-inflamatoria, siempre debe considerarse, de una parte, la composición química del extracto y la posible contribución que alguno o cada uno de los componentes aportan al efecto observado y de otra, tratar de estudiar el mayor número de posibles especies intermediarias y vías metabólicas involucradas en el proceso ⁽²⁷⁷⁾. De esta forma, se realizará una mejor contribución a la verdadera caracterización de los mecanismos farmacológicos por los que dicho extracto ejerce su acción anti-inflamatoria.

En el presente estudio se aplicaron diferentes ensayos in vivo e in vitro para la evaluación de la acción anti-inflamatoria del extracto de M. indica. Además, se evaluó la posible implicación de su componente mayoritario, la mangiferina, en parte de los ensayos realizados. Este extracto, obtenido de la corteza de variedades seleccionadas de la especie Mangifera indica L. y que se comercializa en Cuba bajo la Marca Registrada VIMANG, contiene una mezcla definida de polifenoles, terpenoides, esteroides, ácidos grasos y microelementos ^(29, 257).

Estudios previos demostraron que el extracto de M. indica presentó una poderosa actividad secuestradora de radicales hidroxilos y ácido hipocloroso, un significativo efecto inhibitorio sobre la peroxidación de fosfolípidos de cerebro de rata e inhibió el daño al ADN inducido por bleomicina o el sistema cobre-fenantrolina y la producción de H₂O₂ en

macrófagos peritoneales estimulados in vivo con TPA ^(31, 32). Mangiferina (que se encuentra en el extracto aproximadamente en un 20 %) fue evaluada in vitro por sus propiedades antioxidante ⁽²⁷⁸⁾, inmunoestimulante y antiviral ⁽²⁷⁹⁾. Su aglicona (noratiriol) también fue evaluada in vitro como inhibidor del estallido respiratorio inducido por fMLP en neutrófilos de rata ⁽²⁸⁰⁾ y en un modelo de pleuresía y algia inducidas en ratones por el ionóforo de calcio A23187 ⁽²⁸¹⁾. En este último ensayo, los autores demostraron que la aglicona inhibía los metabolitos del AA como PGs y LTs y que esta acción probablemente sería la responsable, al menos en parte, de los efectos analgésico y anti-inflamatorio de este compuesto.

La asociación entre antioxidantes e inflamación proviene inicialmente de considerar que se producen radicales libres durante el proceso inflamatorio por los macrófagos. Es conocido que las especies reactivas de oxígeno median vía COX y LOX, la conversión de AA en intermediarios proinflamatorios ⁽¹¹⁶⁾. Sobre esta base, varios antioxidantes sintéticos y naturales han sido evaluados por sus propiedades analgésicas y anti-inflamatorias ^(282, 283). En la actualidad, la estrategia de búsqueda de nuevos agentes anti-inflamatorios se basa en la obtención de un producto que combine las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes. También, se ha demostrado que al modificar la estructura de anti-inflamatorios conocidos como indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, etc. mediante la incorporación de una molécula con propiedades antioxidantes como la cisteamina, se potencializa el efecto anti-inflamatorio de ellas ⁽²⁸⁴⁾.

Las propiedades anti-inflamatorias del extracto de M. indica se evaluaron en modelos de inflamación en animales de experimentación. Cada modelo presenta cierta especificidad en cuanto a la relevancia de los mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, lo cual permitió considerar algunos mediadores que son susceptibles a la acción del extracto y de hecho diseñar modelos in vitro para tener la mayor certeza del mecanismo de acción por el

cual ocurre la propiedad farmacológica descrita.

4.1. El extracto de M. indica inhibe elementos importantes dentro de la cascada del AA tales como FLA₂, PGE₂ y LTB₄

El extracto de M. indica presentó actividad inhibitoria sobre la enzima FLA₂ de secreción sinovial humana y este efecto fue debido, en parte, a la presencia de la mangiferina en el extracto (Tabla 6). Las enzimas FLA₂s de secreción ejercen efectos proinflamatorios en algunos modelos animales ⁽²⁸⁵⁾.

Existen evidencias de una estrecha relación entre los niveles elevados de FLA₂ de secreción extracelular y el desarrollo de patologías. Las FLA₂ de secreción fueron en sus inicios aisladas de células y fluidos inflamatorios, los que sugirió la participación de ellas en respuestas inflamatorias locales y sistémicas ⁽⁹⁷⁾. Además, varias citocinas proinflamatorias (tales como IL-1, IL-6 y FNT α) inducen la transcripción génica de FLA₂ de secreción, seguida de la generación de eicosanoides en una amplia variedad de células ⁽²⁸⁶⁾. También, el bloqueo de estas actividades enzimáticas inhibe el desarrollo de las respuestas inflamatorias ⁽²⁵⁹⁾.

Bajo ciertas condiciones fisiológicas y(o) fisiopatológicas se produce la pérdida brusca de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de membrana, como se ha observado en las plaquetas tratadas simultáneamente con la trombina y el colágeno, en células endoteliales y plaquetas sometidas a la acción de las porforinas (complejos de ataque a la membrana) o células en apoptosis. Esta disasimetría fosfolipídica facilita la acción de la FLA₂ de secreción al quedar expuestos los fosfolípidos de la hemicapa interna de la membrana. Recientemente se ha planteado la existencia de una enzima conocida como escambrasa o flipasa que cataliza el paso de los fosfolípidos de la cara interna a la externa (movimiento de flip-flop) con la consiguiente pérdida de la distribución asimétrica de estos en la membrana, lo que provoca la evaginación de esta y la formación de microvesículas que se

desprenden. Existen evidencias experimentales de la formación de estas microvesículas y su correlación con el incremento de la actividad de la FLA₂ de secreción ⁽²⁸⁷⁾.

El extracto de M. indica pudiera impedir la pérdida de esta asimetría y por tanto contribuir a la baja actividad de esta enzima cuando él está presente en el medio.

Otros estudios realizados en células, plantean la hipótesis de que la FLA₂ de secreción se encuentra dentro de gránulos o vesículas celulares y que esta es movilizada por exocitosis. De esta manera, la FLA₂ podría enlazarse a la membrana externa, quizá vía proteoglicanos de sulfato de heparinas o a través de receptores específicos. El extracto también podría inhibir la activación de la FLA₂ de secreción al disminuir los niveles de Ca²⁺ extracelular, la hidrólisis de la capa externa de la membrana plasmática y, de esta forma, impedir la liberación del AA ⁽²⁸⁸⁾; pero esta hipótesis está aun por demostrar.

También, existen evidencias de que los polifenoles (además de mangiferina) ejercen acción inhibitoria sobre la FLA₂ de secreción in vitro ⁽²⁸⁹⁾, por lo que la presencia de este tipo de compuestos en el extracto de M. indica pudiera ser la responsable de esta actividad.

El metabolismo del AA vía COX conduce a la generación de PGs y TXs que median el dolor y el edema asociados con la inflamación ⁽²⁹⁰⁾. La vía de LOX utiliza AA para producir LTs, que incluyen el agente quimioatrayente de leucocitos LTB₄. Debido a la contribución de los LTs a la patogénesis de los procesos inflamatorios, ellos también representan un blanco importante para la regulación terapéutica de la inflamación ⁽²⁹¹⁾.

En este estudio se utilizó el modelo de edema plantar inducido por carragenano debido a que es un procedimiento de tamizaje en el cual están involucrados los productos del metabolismo del AA vía COX y la producción de especies reactivas del oxígeno están bien establecidas ^(144, 292). Se ha publicado que el edema por carragenano muestra cuatro fases distintas: una fase inicial en la que se liberan histamina y serotonina, una segunda fase mediada por cininas, una tercera fase (alrededor de las cinco horas) en la cual se sospecha

que se liberen PGs y una cuarta fase vinculada con infiltración local de neutrófilos y activación de ellos ⁽²⁹³⁾.

El extracto de M. indica, administrado por vía oral durante tres meses, inhibió el edema plantar inducido por carragenano a las cinco horas (Tabla 4). El hecho de que el extracto inhiba el edema inflamatorio inducido por agentes irritantes podría ser interpretado como que este pudiera modular los receptores de PGs o la liberación de estas sustancias, así como las enzimas responsables de convertir el AA en PGs, como es el caso de la FLA₂ ^(294, 295). Por otra parte, y debido a la acción antioxidante del extracto este podría inhibir la liberación de especies reactivas del oxígeno que se liberan en este proceso como son el ON, radical superóxido y peroxinitritos ⁽²⁹⁶⁾.

En estudios anteriores, el extracto de M. indica, administrado p.o. una hora antes de la inyección de carragenano, no hubo un efecto dependiente de la dosis ⁽²⁷⁶⁾. Este pobre efecto pudiera deberse a la baja biodisponibilidad oral de los polifenoles presentes en la mezcla que conforma dicho extracto, los que han demostrado ser efectivos sobre la proliferación celular y la apoptosis, así como sobre eventos de transducción de señales importantes en el proceso inflamatorio ⁽²⁹⁷⁾. En estudios recientes, se ha comprobado que las catequinas (como las presentes en el extracto) alcanzan la circulación sistémica pero la biodisponibilidad oral es baja en humanos ⁽²⁹⁸⁾. Para los flavonoides esta biodisponibilidad oral también es baja en ratas, posiblemente debido a una pobre absorción en el intestino y(o) un amplio metabolismo en intestino y en hígado ⁽²⁹⁹⁾.

En estudios anteriores en los que se demostró el efecto antioxidante del extracto tampoco fue posible encontrar una relación dependiente de la dosis para todas las variables analizadas. En estos trabajos se consideraba que los marcadores del daño oxidativo a las diferentes biomoléculas no siempre muestran el mismo comportamiento y que esto ocurría probablemente debido a la diferencia existente en la reactividad de cada una de las

biomoléculas frente a las especies reactivas del oxígeno. Otro aspecto importante que se señalaba era la proporción en que se encuentran las biomoléculas, la irrigación sanguínea, el acceso de la droga al tejido, entre otras ⁽³⁰⁰⁾.

Sin embargo, cuando el extracto fue administrado en dosis repetidas durante tres meses si hubo un efecto dependiente de la dosis. Estos resultados coinciden con hallazgos anteriores en los que se plantea que los metabolitos de algunos polifenoles presentes en el extracto (tales como ácido gálico, catequinas; así como la quercetina, con un tiempo de vida media más amplio) pudieran acumularse en plasma por administraciones repetidas de estos compuestos ⁽³⁰¹⁾.

El extracto de M. indica inhibió la liberación de PGE₂ y LTB₄ en macrófagos estimulados con LPS-IFN γ y el ionóforo de calcio A23187 (Tabla 7). De esta forma se confirmaron los resultados obtenidos en los modelos in vivo de formación de edema plantar en que se sospecha que están involucrados los eicosanoides ^(293, 302). Se ha probado que los macrófagos son una fuente importante de metabolitos del AA generados vía COX y LOX ⁽²⁹⁰⁾ y que participan en la defensa del hospedero, la inmunidad y la respuesta inflamatoria donde ellos son potencialmente activados para producir citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y eicosanoides. En estas células, el LPS solo o en combinación con citocinas como IFN γ , y el ionóforo de calcio A23187 son los estímulos mejor caracterizados para inducir la transcripción de genes que codifican para las proteínas proinflamatorias, lo que trae como consecuencia la liberación de citocinas y la síntesis de enzimas tales como COX-2 y 5-LOX. Las isoformas inducibles de COX-2 y 5-LOX podrían ser las responsables de la alta generación de prostanoïdes durante la respuesta inflamatoria ⁽³⁰³⁾ por lo que el extracto podría actuar sobre ambas enzimas.

Sobre la base de estos hallazgos, el extracto de M. indica inhibió ambas vías del metabolismo del AA (COX y LOX), lo que sugiere que el extracto podría clasificarse

como inhibidor dual de esta vía. Además, el paso precedente a la liberación del AA, el cual es catalizado por FLA₂, también fue blanco del extracto de M. indica con un marcado efecto inhibitorio.

Varias observaciones indican que puede existir interacción entre las isoformas de COX y la ONS. El ON puede estimular la síntesis de PGs, mientras que las PGs incrementan la actividad de la ONS⁽³⁰⁴⁾.

De hecho, existen varios estudios que le atribuyen al ON un rol como molécula reguladora de la vía de los eicosanoides. En alguno de ellos se demostró que la producción de PGE₂ y COX-2 por células A249, en respuesta a la estimulación por citocinas, estuvo acompañada por un incremento en los niveles de ON y la correspondiente enzima ONSi. También, se comprobó que el pre-tratamiento con quercetina o amentoflavona (dos flavonoides reportados en la especie M. indica) disminuyeron completamente la generación de ON en células A549, sin interferencia con la ONSi a nivel transcripcional⁽³⁰⁵⁾.

Los diferentes efectos observados con los flavonoides parecen estar relacionados con su estructura. El potente inhibidor de COX-2, la quercetina, tiene un doble enlace C2–C3 en el anillo B y un grupo hidroxilo 3' y 4' en el anillo B. También, la quercetina, la galangina y la apigenina pueden inhibir la expresión de la ONSi mediante la modulación de la actividad de la enzima relacionada con la señal de transducción⁽³⁰⁶⁾. Todos estos flavonoides decrecen la liberación de PGE₂ y la expresión de COX-2 en una manera dependiente de la concentración en la línea celular macrofágica J774A.1 inducida por LPS. De la misma manera la penta-acetato de quercetina, pero no la quercetina o la rutina, mostró fuerte actividad inhibitoria sobre la producción de PGE₂ y la expresión de COX-2 en células RAW 264.7 tratadas con inhibidores de la ONSi y co-tratadas con LPS⁽³⁰⁷⁾.

Otro mecanismo potencial por el cual los flavonoides ejercen su acción inhibitoria sobre la expresión de COX-2 es a través de la alteración de la vía del NF-κB. La roxilina A es un

efectivo inhibidor de la expresión génica de COX-2 inducida por LPS mediante el bloqueo de NF-κB en macrófagos RAW264.7 ⁽³⁰⁸⁾.

En un estudio realizado recientemente, la apigenina, la genisteína, y el kaempferol resultaron inhibidores potentes de la activación transcripcional de COX-2 en macrófagos RAW264.7 activados por LPS. La apigenina fue el inhibidor más potente de la activación transcripcional tanto de COX-2 como de la ONSi, ya que bloqueó la activación de NF-κB inducida por LPS ⁽³⁰⁹⁾. En otro estudio, el biflavonoide amentoflavona (presente en la especie M. indica), inhibió la expresión de COX-2 en células A549 activadas por el FNTα con una inhibición concomitante de las cascadas de señales mediadas por el NF-κB ⁽³¹⁰⁾.

La curcumina, un pigmento amarillo natural presente en los rizomas de la especie Curcuma longa L., se usa ampliamente en el manejo de diferentes desórdenes inflamatorios y cicatrización de heridas. Los estudios muestran que este polifenol posee acciones antioxidante, hepatoprotectora y antitumoral. Recientemente, ha aumentado el número de estudios pre-clínicos que sugieren que la curcumina ejerce una acción anti-inflamatoria en modelos de aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, artritis and pancreatitis. Varios han sido los mecanismos propuestos para explicar esta acción anti-inflamatoria que incluyen la inhibición de la activación de macrófagos y la inhibición de las enzimas LOX y COX-2 ⁽³¹¹⁾.

El resveratrol es otro polifenol presente en la cáscara de la uva y en otras muchas plantas. Este presenta un amplio rango de acciones biológicas que incluyen actividades anti-alérgica, anti-inflamatoria, antioxidante, anti-cancerígena y anti-plaquetaria. En relación con sus acciones anti-inflamatorias, se ha encontrado que este compuesto inhibe las enzimas COX-1 y COX-2 y la generación de prostanoïdes vía LOX. Además, resveratrol inhibe la apoptosis en células K562 a través de un mecanismo que involucra las actividades de LOX y COX. Estudios moleculares recientes han revelado que el resveratrol actúa en un

amplio rango de sitios y esto parece muy probable debido a sus propiedades farmacológicas⁽³¹¹⁾.

La baicaleína es otro polifenol aislado de las raíces de Scutellaria baicalensis Georgi que presenta actividad inhibitoria de la enzima 5-LOX y también de la producción de LTC₄ en macrófagos peritoneales aislados de rata. Además, la baicaleína, la baicalina y wogonina presentan propiedades anti-edematogénicas en ratas. La baicalina también inhibe la producción de PGE₂ en células de glioma de ratas C6 y la biosíntesis de LTB₄, mientras la oroxilina A, baicaleína y wogonina inhiben la 12-LOX sin afectar los niveles de COX en plaquetas humanas⁽³¹¹⁾.

Varios ácidos grasos extraídos de Plantago major L. tales como ácido linoleico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico (algunos presentes en el extracto de M. indica) presentan actividades inhibitorias sobre COX-1 y COX-2. Otro ácido fenólico que presenta actividad antioxidante es el feniléster del ácido caféico (CAPE), un compuesto producido por abejas melíferas de la resina de varias plantas y que posee propiedades anti-inflamatoria, anticarcinogénica, anti-mitogénica e inmunomoduladora. El CAPE inhibió las actividades enzimáticas tanto de COX-1 como COX-2 junto con la expresión de COX-2 en células epiteliales orales humanas. También el CAPE mostró una completa inhibición de la formación de PGE₂ y COX-2 cuando se administró sistémicamente en un modelo de inflamación de bolsa de aire con carragenano en ratas⁽³¹¹⁾.

Por último, algunos extractos estandarizados de plantas se usan comúnmente en muchos países para el manejo de varias patologías que interfieren con la síntesis de prostanoides, fundamentalmente vía inhibición de las actividades de COX y LOX. Ejemplos de plantas que producen tales extractos son: Echinacea purpurea L., Hammamelis virginiana L., Tanacetum vulgare L., Urtica dioica L., Rheum palmatum L., Arnica montana L., Allium sativum L., Heterotheca inuloides Cass., Angelica sinensis (Oliv.) Diles y especies de

Artemisia, entre otras ⁽³¹¹⁾. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, a esta lista se podría añadir el nombre de Mangifera indica L.

4.2. El extracto de M. indica inhibe mediadores proinflamatorios clave tales como FNT α y ON

En el presente trabajo, al estudiar la acción anti-inflamatoria del extracto acuoso de M. indica se comprobó mediante ensayos realizados in vitro, que dicho extracto inhibió de forma significativa la producción de FNT α y ON en macrófagos activados con LPS e IFN γ (Figs. 3, 4, 5 y 6). Estos hallazgos, encontrados al trabajar con células murinas de origen macrofágico, las RAW264.7 y las células microgliales N9, permitieron considerar al FNT α y el radical ON, como importantes mediadores proinflamatorios, blancos de la acción farmacológica del extracto en cuestión.

El FNT α ha constituido uno de los mediadores más estudiado en los procesos inflamatorios ⁽³¹²⁾. Esta citocina se induce en las primeras horas de la inflamación, y constituye señal iniciadora para la biosíntesis de otras citocinas y mediadores proinflamatorios con ella relacionados ⁽⁶⁾. Anticuerpos anti-FNT α , fueron utilizados con éxito en diversos modelos experimentales, los cuales lograron revertir el desarrollo de la reacción inflamatoria ⁽⁶⁸⁾. Sin embargo, estudios clínicos realizados con ellos no demostraron una total eficacia en determinadas condiciones patológicas, tales como la total protección contra el choque séptico ⁽³¹³⁾. Para otros casos, como pacientes afectados de procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoide) se obtienen resultados más alentadores en relación con el empleo de métodos terapéuticos a partir de anticuerpos anti-FNT α ⁽³¹⁴⁾. En general, se considera que resulta importante inhibir el FNT α , pero lógicamente, no basta sólo con esto para lograr un efecto de protección en el contexto de un proceso inflamatorio agudo, pues otras citocinas proinflamatorias de temprana

inducción, como IL-1, IL-6, IL-8, entre otras, también se activan, y a pesar de que el FNT α pueda estar bloqueado, ya el proceso de activación celular que se produce por acción de algunas de estas citocinas, continúa desarrollándose ⁽³¹⁵⁾. No obstante estos hechos, por el papel fisiopatológico que le es atribuido al FNT α , este aún se considera un mediador clave en el proceso inflamatorio, y si bien otras citocinas siguen en acción, siempre la respuesta inflamatoria se encontrará regulada de algún modo, al estar bloqueada la biosíntesis del FNT ⁽³¹⁶⁾. Además, no debe descartarse, la posibilidad que el extracto pueda inhibir la producción de alguna otra citocina proinflamatoria, dentro del complejo sistema de señales de comunicación intercelular, que se activa durante el proceso inflamatorio.

En los resultados obtenidos en este estudio, a través de la inhibición por parte del extracto de M. indica, del edema plantar inducido por LPS (Tabla 4) y la producción tisular del FNT α (Tabla 5), la inyección de LPS y carragenano causaron una elevación pronunciada en los niveles de FNT α en el exudado plantar a una y cinco horas, respectivamente; en correspondencia con otros estudios publicados anteriormente ⁽³¹⁷⁾.

Por otra parte, la indometacina (un inhibidor no selectivo de COX) no suprimió la elevación de los niveles de FNT α inducidos por carragenano. Es de destacar que, en estudios previos tanto in vivo como in vitro, se encontró que la indometacina elevó los niveles de FNT α ^(318, 319).

Estudios recientes en el modelo de inducción de edema por carragenano han concluido que el carragenano estimula la liberación de FNT α , la cual, a su vez, induce la producción de otras citocinas (como IL-1, IL-6 e IL-8), así como la estimulación de la producción de mediadores derivados de COX y de la producción local de aminas simpáticas. De este modo, una liberación de citocinas precede la producción de eicosanoides y aminas simpatomiméticas ⁽³²⁰⁾.

La acción proinflamatoria del FNT α depende, a parte de la transcripción génica dirigida a NF- κ B, a la activación de FLA₂, esto da como resultado la liberación de AA de los fosfolípidos de membrana. Esta liberación de AA constituye la proporción que limita el paso en la biosíntesis de prostaglandinas (vía COX), leucotrienos (vía 5-LOX) y el factor activador de plaquetas, los cuales actúan como potentes mediadores inflamatorios. Los metabolitos del AA, especialmente los leucotrienos, también actúan como segundos mensajeros intracelulares en la acción del receptor de FNT; así como en los eventos de transducción de señales de otras citocinas ⁽³²¹⁾.

Por otra parte, en estudios recientes se demostró que existe un incremento del FNT α en el tejido plantar inyectado con carragenano sin elevación de los niveles de esta citocina en suero. Este incremento fue bloqueado por la administración de un anticuerpo anti-FNT α que inhibió tanto la formación del edema como los niveles de FNT α en tejido ⁽³²²⁾.

Constituye un hecho relevante, que el extracto de M. indica, no solo logró revertir la inducción de FNT α in vitro, en células que participan directamente en la biosíntesis de dicha citocina (los macrófagos), sino que tal acción también la manifiesta in vivo, administrado oralmente, (Figs. 1 y 2), a dosis entre 50 y 200 mg/kg, en los modelos de edema plantar y de choque endotóxico, en los cuales se produce la mayor parte de los eventos que caracterizan la reacción inflamatoria aguda ⁽³²³⁾. Además, el efecto inhibitorio observado sobre la inducción de FNT α , se pudo apreciar que se produce al nivel de la formación del transcrito primario para esta citocina, es decir, al nivel de la transcripción de los genes que regulan su biosíntesis.

Por otra parte, los estudios realizados permitieron apreciar un efecto inhibitorio in vitro sobre otro importante mediador de la respuesta inflamatoria, el radical libre ON, muy relacionado con la biosíntesis del FNT α ⁽³²⁴⁾. Resulta de interés puntualizar que la acción

inhibitoria, encontrada en macrófagos activados con LPS e $\text{IFN}\gamma$, está directamente relacionada con un efecto sobre la inducción en estas células de la ONSi. Este aspecto aún debe ser estudiado con mayor profundidad, pues el efecto que se observa sobre la producción de nitritos totales in vitro, no ofrece un dato conclusivo sobre el mecanismo del proceso inhibitorio observado. Sólo se conoce que se reducen marcadamente estos metabolitos estables del ON, resultantes de la inducción de la ONSi, pero falta precisar si el proceso inhibitorio ocurre a nivel del transcrito primario o a otro nivel de la ruta biosintética de esta proteína.

En este estudio, se realizó el primer reporte de la acción del extracto de M. indica y la mangiferina sobre la inhibición de la producción del $\text{FNT}\alpha$ in vitro (en macrófagos) e in vivo (en los modelos murinos de edema plantar y de choque endotóxico), así como inhibición en la producción del radical ON in vitro (en macrófagos).

Es de destacar que el efecto inhibitorio logrado tanto por el extracto de M. indica como por mangiferina sobre células microgliales resulta de especial interés. Las microglías son macrófagos residentes del sistema nervioso central (SNC) ⁽³²⁵⁾. Existen evidencias de que los monocitos intervienen en el desarrollo del SNC y son transformados en microglías ⁽³²⁶⁾. Las microglías activadas producen factores solubles que incluyen citocinas, PGs, ON y especies reactivas de oxígeno, que son cruciales en la defensa del hospedero contra infecciones del SNC ⁽³²⁷⁾. Sin embargo, la producción excesiva de mediadores proinflamatorios puede ser dañina. El $\text{FNT}\alpha$ ha sido encontrado en lesiones de esclerosis múltiple ⁽³²⁸⁾; en la enfermedad de Alzheimer se cree que medie el daño neuronal inducido por beta amiloide ⁽³²⁹⁾; la glicoproteína gp120 de envoltura del VIH causa muerte celular apoptótica en células cerebrales humanas a través de la inducción del $\text{FNT}\alpha$ e IL-6 ⁽³³⁰⁾.

El ON, al igual que el $\text{FNT}\alpha$, está vinculado a la toxicidad neuronal ⁽³³¹⁾. El ON es un neurotransmisor en el cerebro con numerosas funciones neuroreguladoras; sin embargo, la

excesiva producción de ON es tóxica para las neuronas. Debido a que la microglia activada y los macrófagos del cerebro son la fuente fundamental de FNT α y ON en el SNC, las moléculas que reduzcan la inflamación cerebral inhibirían la actividad de estos fagocitos centrales. En este estudio, las células microgliales fueron sometidas a la activación por LPS e IFN γ porque la acción combinada de estos dos agentes resulta en una producción potente de FNT α y ON ⁽³³²⁾. Esta sobreproducción fue inhibida por el extracto de M. indica y la mangiferina en una manera dependiente de la concentración, aunque los efectos mostrados por el extracto fueron más altos (Fig. 5) que los obtenidos para mangiferina (Fig. 6). Esta constituye otra posible explicación del efecto protector ejercido por el extracto (administrado p.o) sobre la isquemia-reperfusión cerebral de Gerbils de Mongolia ⁽³⁴⁾ en la cual estos mediadores son considerados deletéreos. En el referido estudio, el extracto también produjo reducción en los niveles de ON en homogenado de hipocampo. Datos estos, que junto a los obtenidos con células de microglia activadas, constituyen un importante hallazgo a la hora de considerar el potencial terapéutico de dicho extracto, para el posible tratamiento de patologías neurodegenerativas e infecciosas, que tengan como blanco el SNC, donde las citocinas proinflamatorias, el ON y diversas especies reactivas de oxígeno, han sido identificadas dentro de los agentes etiológicos principales ⁽³³³⁾.

Además, debido a que la producción excesiva de ON, paralelamente a la superproducción del FNT α , se cree que contribuya a la patogénesis de otras enfermedades (que incluyen inflamación, infecciones, cánceres y enfermedades autoinmunes), ^(157, 334) se podría esperar que el extracto de M. indica sea útil en la prevención de alguna de estas enfermedades.

Los efectos inhibitorios encontrados para el extracto de M. indica frente a la producción tanto in vitro como in vivo de citocinas proinflamatorias (como el FNT α) y de la inducción de la ONSi in vitro, podrían justificarse por su alto contenido de polifenoles, dentro de los cuales la mangiferina se encuentra como componente mayoritario ⁽²⁹⁾.

Estudios recientes, reflejan el efecto inhibitorio de una flavona polimetoxilada de origen natural sobre la producción del FNT α en monocitos humanos ⁽⁸⁹⁾. Probablemente, los efectos observados con la administración del extracto de M. indica pudieran relacionarse, de una parte con la regulación que los polifenoles presentes en el extracto puedan desarrollar sobre la activación de factores nucleares decisivos para la biosíntesis de proteínas proinflamatorias y por otra, por un efecto más directo sobre el propio proceso biosintético de estas proteínas, a partir de la regulación de los procesos de transcripción de ellas.

Existen numerosas evidencias, obtenidas en estudios tanto in vivo como in vitro, que soportan el concepto que varios compuestos derivados de plantas con propiedades antiinflamatorias ejercen sus efectos a través de la modulación de citocinas proinflamatorias como el FNT α . Por ejemplo, flavonoides tales como luteolina, quercetina, luteolina 7-glucósido, eriodictiol, hesperetina y el isoflavonoide genisteina inhiben la liberación de TNF α , estimulada por LPS, en macrófagos RAW264.7. También, se han realizado estudios con un extracto estandarizado de Ginkgo biloba L. y la quercetina aislada de este, en los que ambos inhibieron la secreción de FNT α en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS por inhibición de factores transcripcionales. Quercetina y el 3-*O*-metil éter de quercetina, aislados de Rhamnus nakaharai Hayata; así como amoradicina aislada de Amorpha fruticosa L., inhibieron marcadamente la producción de FNT α en macrófagos murinos estimulados con LPS. El 3-*O*-metil éter de quercetina también causó una inhibición pronunciada de la formación de esta citocina en células microgliales murinas N9 estimuladas con LPS e IFN γ . La epigalocatequina galato, los taninos geraniina y corilagina y el extracto acuoso de las hojas de Acer nikoense Maxim. previnieron la liberación de FNT α en células BALB/3T3 estimuladas con ácido akadaico ⁽³³⁵⁾.

Varios compuestos aislados de plantas también han sido evaluados por su capacidad inhibidora de la actividad y la expresión de la ONSi. El resveratrol suprime tanto la expresión de la ONSi como la producción de ON en cultivos de células de macrófagos RAW264.7 y J774. Por su parte, la curcumina es un potente inhibidor de la ONSi y ON en macrófagos y en tejido pancreático de ratas. La silimarina también reduce la producción de ON y la expresión de la ONSi en macrófagos peritoneales de ratones tratados con LPS. Se ha observado que esta acción es debida a la inhibición de la activación del NF- κ B. Otros compuestos fenólicos también decrecen la producción de ON, como son: wogonina, baicaleína, baicalina, quercetina, brousochalcone A, apigenina, luteolina, morusina, kuwanon C, sanggenon D, bilobetin, ginkgetin, equinoisoflanona, genisteina, daidzeina, gliciteina, teaflavina 3,3'-digalato y epigallocatequin 3-galato ⁽³¹¹⁾.

Los terpenos también han sido evaluados como inhibidores de la producción de ON. El tratamiento con partenolide o isohelenina reduce la producción de ON y la expresión del ARNm de la ONSi en cultivo de células musculares lisas de aorta de rata tratadas con LPS e IFN γ por un mecanismo que involucra la estabilización del complejo I κ B/NF- κ B. Otros terpenos que han sido evaluados como inhibidores de la producción de ON son: yacuchinonas A y B, celastrol, avicina, kaurane, prunioside, hipoestoxido, ergolide, costunolide, pimobendan, andrografolide, auranofina, pristimerina, dehidrocostus lactona, alfa-triterpeno, antraquinona y furanoligularenone, entre otros ⁽³¹¹⁾.

También, en el extracto de M. indica se encuentran presentes microelementos importantes como el selenio, el zinc y el cobre ⁽²⁵⁷⁾ que constituyen cofactores de diversas vías enzimáticas o participan en diferentes procesos, relacionados con la eliminación de especies reactivas de oxígeno y sistemas endógenos de defensa antioxidante ^(33, 336), entre otras acciones. Estos aspectos, resultan trascendentales a la hora de realizar una completa interpretación de los mecanismos de acción anti-inflamatoria de un producto natural, y la

presencia de dichos elementos en el extracto, contribuye indudablemente a la acción anti-inflamatoria dilucidada en este estudio.

Las reacciones inflamatorias y el choque séptico o endotóxico son estados patológicos complejos y multifactoriales ⁽³³⁷⁾. Por esta razón, la modulación farmacológica y los mecanismos característicos de los procesos inflamatorios asociados a los eventos sépticos y a la inflamación global, están aún bajo investigación con el fin de obtener nuevos fármacos o identificar blancos terapéuticos de interés. La investigación de fuentes alternativas de compuestos terapéuticos que manifiesten actividad en el tratamiento de estos desórdenes constituye en la actualidad un campo científico de significativa importancia. En este estudio, la actividad anti-inflamatoria del extracto de M. indica se manifestó por la inhibición de la sobreproducción del FNT α en el choque endotóxico inducido por la administración i.p de LPS en los ratones (Fig. 1) y esta inhibición fue regulada a nivel de ARNm del FNT α (Fig. 2). Este evento fue dependiente del tiempo de administración ya que la inhibición de esta citocina se manifestó cuando los ratones fueron tratados, por vía oral, una sola vez o durante siete días antes de la inyección de LPS. Es necesario señalar la diferencia entre las DE_{50s} de los dos tratamientos realizados (64,5 mg/kg en el tratamiento agudo y 37,4 mg/kg en el tratamiento por siete días) por lo que pudiera pensarse que el extracto sea más efectivo p.o cuando se administra en dosis repetidas (como ya se comprobó en el modelo del edema plantar por carragenano).

El choque séptico es un estado patológico complejo caracterizado por disturbios metabólicos, cardiovasculares y hemodinámicos significativos, los cuales pueden ocasionar fallo multi-órgano ⁽³³⁸⁾. Estudios experimentales y clínicos demuestran que la exposición a LPS trae consigo la liberación de varios mediadores inflamatorios, aunque han tenido particular atención las citocinas proinflamatorias como el FNT α , y las especies reactivas

del oxígeno y del nitrógeno como el ON, los cuales comúnmente son considerados mediadores clave del tejido dañado y la mortalidad en el choque séptico ^(339, 340).

En este estudio, la actividad anti-inflamatoria y los efectos inhibitorios del extracto de M. indica y del conocido antioxidante y componente mayoritario del extracto, la mangiferina, sobre los niveles de FNT α en el suero de los ratones tratados con LPS podrían ser consecuencia de los efectos que ejercen ambos sobre la producción de eicosanoides, así como las propiedades antioxidantes del extracto y su glucosilxantona ^(32, 34). Este punto de vista es apoyado por el hecho de que las especies reactivas del oxígeno están fuertemente involucradas en la inducción y desarrollo de los procesos inflamatorios (producción de PGs y LTs) y en la patogénesis del choque endotóxico ⁽³⁴¹⁾. Por otra parte, varios antioxidantes con propiedades secuestradoras de especies reactivas de oxígeno, antagonistas de leucotrienos e inhibidores de LOX han protegido los animales contra el daño orgánico mediado por endotoxina y reducido los niveles de FNT α en sangre ^(342, 343). Estos efectos de los agentes antioxidantes han sido atribuidos por algunos autores a la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, el cual es activado por especies reactivas de oxígeno con la subsecuente inducción y expresión de varias citocinas y enzimas tales como FNT α y ONSi, respectivamente ^(25, 154), que están involucradas en el desarrollo del choque endotóxico. Como ocurre con otros antioxidantes, el extracto de M. indica podría ejercer sus efectos sobre el choque endotóxico por inhibición de la activación del NF- κ B. Varios estudios destacan que la activación por LPS de los niveles máximos de expresión del FNT α es dependiente de NF- κ B. Mutaciones puntuales en cualquiera de los tres sitios κ B, o su espaciamiento artificial, reducen la activación transcripcional inducida por el LPS en más del 80% ^(344, 345). Esto también podría explicar los efectos inhibitorios

del extracto sobre los niveles de FNT α sistémico y su ARNm en pulmón e hígado de ratones.

Por otra parte, el tratamiento con LPS está asociado a un incremento en la peroxidación lipídica en el hígado; esta es una de las consecuencias del daño oxidativo. Recientemente, se ha visto que el daño oxidativo puede estar implicado en la toxicidad del FNT α en ratas, así como en su citotoxicidad sobre células tumorales. Estos reportes han mostrado que la disminución del glutatión endógeno, uno de los mayores componentes del sistema antioxidante de las células, está asociado con un incremento de la sensibilidad para el FNT α ⁽³⁴⁶⁾. Los efectos beneficiosos demostrados por el extracto de M. indica podrían estar dados por su acción protectora sobre la peroxidación lipídica en el hígado y cerebro ^(31, 32) y al contenido de Se presente en el extracto ⁽³⁰⁾. El Se es un cofactor esencial para la GPx, enzima que reduce el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos ^(347, 348). En estudios recientes se ha demostrado que el extracto de M. indica (250 mg/kg, p.o) revierte, hasta niveles normales, la disminución de la enzima GPx cuando los ratones son inyectados con TPA, un inductor de la peroxidación lipídica ⁽³²⁾. Además, otras investigaciones concluyeron que el glutatión endógeno desempeña un papel importante en la hipo-reactividad vascular y la disfunción endotelial en respuesta a peroxinitritos y choque endotóxico, así como en la inflamación aguda. Una variedad de procesos citotóxicos aditivos o sinérgicos estimulados por los peroxinitritos pudiera contribuir a una citotoxicidad aguda o retardada, una disminución de los niveles de glutatión pudiera también interferir con este proceso. Esto señala la importancia del mantenimiento de los niveles de glutatión normales en el organismo, como un mecanismo protector contra el daño vascular bajo estrés oxidativo, choque e inflamación ⁽³⁴⁹⁾.

Estos resultados sugieren que los polifenoles y microelementos presentes en el extracto de M. indica (como mangiferina, Se y otros) son probablemente responsables de la inhibición

de la producción del FNT α en el choque séptico. Esta actividad es muy importante para la acción anti-inflamatoria de este extracto natural y está en correspondencia con otras investigaciones de inhibidores naturales sobre esta citocina en el proceso inflamatorio ^(89, 350).

Por otra parte, existen numerosas evidencias que implican los radicales libres derivados de oxígeno (especialmente radicales superóxido e hidroxilo) y oxidantes de alta energía (como los peroxinitritos) como mediadores de la inflamación, el choque endotóxico y la isquemia-reperfusión. El papel que desempeñan las especies reactivas de oxígeno consiste en evidencias bioquímicas e inmunohistoquímicas que demuestran la existencia de estas EROs en este tipo de patologías. Las EROs pueden iniciar un amplio rango de reacciones oxidativas tóxicas que incluyen la iniciación de la peroxidación lipídica, la inhibición directa de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, la inactivación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la inhibición de la actividad ATPasa sodio-potasio de membrana, la inactivación de los canales de sodio de membrana y otras modificaciones a proteínas. Todos estos eventos tóxicos probablemente juegan un rol en la patofisiología del choque séptico, la inflamación y la isquemia-reperfusión ⁽²⁹⁶⁾. El tratamiento con antioxidantes que sean capaces de secuestrar estas EROs, como es el caso del extracto de M. indica ⁽³²⁾, podría mejorar la descompensación vascular y la insuficiencia energética celular asociada a estas patologías, que conllevan a daño de órganos.

Durante la última década, se obtuvieron avances significativos en el entendimiento de la vía de señalización del LPS que conduce a la activación de NF- κ B y la transcripción de genes pro-inflamatorios. La vía del NF- κ B representa un blanco terapéutico atractivo en la estrategia para controlar la inflamación aguda y el choque séptico. La comprensión en detalles del sistema NF- κ B, en particular los roles e interacciones de los efectores y

modificadores individuales de la activación de la cascada, será un punto crítico para el desarrollo de terapias anti-endotoxinas para el tratamiento médico del choque séptico en humanos. Sin embargo, cuando se utilizan inhibidores de los mediadores del choque séptico, es importante tener en cuenta que muchos de los mecanismos patogénicos de este estado constituyen la respuesta compensatoria del cuerpo a la sepsis, y de hecho, tienen efectos beneficiosos. Por tales razones, es importante el cuidado que se deba tener a la hora de la investigación y aplicación de tratamientos en esta patología. Existen evidencias crecientes que involucran el estrés oxidativo en el daño tisular inducido por LPS. Estudios bioquímicos y clínicos han indicado que la terapia antioxidante puede ser útil en el tratamiento de estos estados patológicos⁽³⁵¹⁾.

4.3. El extracto de M. indica inhibe la proliferación de linfocitos T y la activación, inducida por FNT α , del NF- κ B

Nuestros resultados demuestran que el extracto inhibió la proliferación de linfocitos T y bloqueó la activación de NF- κ B inducido por FNT α , y que esta inhibición es específica para FNT, como ha sido demostrado con la línea celular HeLa-Tet-Luc (Fig. 8B).

La supresión de la proliferación de células T fue ensayada en este estudio por la importancia de la activación de estas células en la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo de la célula. Está bien establecido que la señalización hacia el núcleo celular juega un papel importante en la respuesta de los linfocitos de T a los estímulos inmunes e inflamatorios. Dentro de los pasos involucrados en esta señalización se encuentra la movilización de varios factores transcripcionales, que incluye NF- κ B, NFAT y STAT, los cuales son secuestrados en el citoplasma, o AP-1 que sigue su síntesis de novo; y la importación de los factores transcripcionales hacia el núcleo donde ellos se enlazan al ADN y activan la transcripción de un amplio número de genes⁽³⁵²⁾.

El extracto de M. indica (concentraciones de 10, 25 y 50 µg/mL) inhibió la proliferación de células T humanas. Varios estudios indican que los compuestos presentes en el extracto de M. indica modulan las actividades encontradas para este ^(353, 354, 355, 356, 357) e inhiben la proliferación estimulada por mitógeno de linfocitos T de sangre periférica ⁽³⁵⁸⁾.

La activación de los linfocitos T ha sido estudiada tanto en la inflamación crónica ^(189, 359) como en la aguda ^(360, 361). Diferentes poblaciones de células T alteran dramáticamente el balance entre el aclaramiento o eliminación del patógeno y la inducción de daño tisular. Esto depende de los mediadores citocínicos que ellos secreten ⁽³⁶²⁾. La activación por citocinas conduce a un incremento rápido en la expresión de genes importantes para el crecimiento, la adhesión y diferenciación celular. En la Fig. 7 se observa como, desde concentraciones de 10 hasta 50 µg/mL, el extracto fue capaz de inhibir la proliferación de células T que habían sido estimuladas previamente con el superantígeno SEB.

En estudios recientes, se comprobó que los polifenoles presentes en una formulación herbal procedente de la medicina tradicional china presentó una potente inhibición en la activación de linfocitos T humanos, aislados de sangre periférica, estimulados con el superantígeno SEB. Este producto inhibió dicha proliferación, a través de la inhibición de la producción de citocinas (tales como FNTα) de una manera dependiente de la concentración ⁽³⁶³⁾.

Por otra parte, se encontró que un extracto catequínico de té verde (cuyos derivados están presentes en el extracto de M. indica) y la (-)-epicatequina galato inhibieron la toxicidad letal inducida por el FNTα que fue producido por administración i.p. de SEB en ratones Balb-c. El extracto también fue capaz de inhibir la producción de FNTα, así como la expresión de su transcritto primario (ARNm). Además, la activación de linfocitos T inducida por SEB fue inhibida por la catequina tanto en estudios in vivo como in vitro, por

lo que se sugirió que estos compuestos podrían ser útiles en enfermedades con manifestaciones de activación T linfocitarias como la dermatitis atópica ⁽³⁶⁴⁾.

Aunque las bases moleculares para las múltiples actividades asignadas al extracto de M. indica no han sido completamente definidas, muchos de los efectos inhibitorios obtenidos en este estudio para dicho extracto requieren de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B. El NF- κ B es un factor de transcripción ubicuo, que desempeña un papel central en el sistema inmune, a través de la regulación de varias respuestas inflamatorias, por la activación transcripcional de ciertas citocinas proinflamatorias (como FNT α), los genes de ONSi, el gen de moléculas de adhesión y otros genes involucrados en la inflamación ⁽³⁶⁵⁾.

Los efectos de amplio rango de NF- κ B están bajo la regulación de una red compleja de inhibidores y coactivadores. La activación de NF- κ B por citocinas inflamatorias, mitógenos, productos bacterianos, o el estrés oxidativo requiere de la degradación de I κ B que sostiene NF- κ B en el citoplasma en un estado inactivo. Después de la degradación de I κ B, el NF- κ B es liberado del complejo I κ B-NF- κ B y se transloca al núcleo donde se enlaza a elementos κ B del ADN y activa diferentes genes ⁽³⁶⁵⁾.

El NF- κ B es el principal factor transcripcional que controla la regulación génica del FNT α y un elemento común en la cascada de señalización inducida a través del receptor del FNT α , para la regulación de la transcripción de genes pro-inflamatorios en la respuesta inmune a elementos patógenos ⁽³⁶⁶⁾.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el extracto de M. indica inhibe la degradación de I κ B y por tanto el enlace de NF- κ B a elementos κ B del ADN en los extractos nucleares (Fig. 9). Este efecto se observó cuando NF- κ B fue activado por el FNT α y se demostró que el extracto es un inhibidor específico de la actividad

transcripcional de NF- κ B (Fig. 8). Por todo lo anterior, se podría clasificar a dicho extracto como inhibidor de NF- κ B y, de este modo, integraría la amplia lista de productos naturales con acción anti-inflamatoria inhibidores de este factor de transcripción nuclear ⁽²⁵⁾.

La vía NF- κ B es afectada por distintas clases de compuestos derivados de plantas que incluyen: curcumina, partenolide, ergolide, 2 β ,5-epoxi-5,10-dihidroxi-6 α -angeloiloxi-9 β -isobutiloxi-germacran-8 α ,12-olide, andalusol, ácido ent-kaur-16-ene-19-oico, kamebanin, kamebacetal A, kamebakaurin, exvisanin A, hipolestoxido, resveratrol, helanina, pristimerina, galato de epigalocatequina, avicina, quercetina, capsaicina, silimarina, oleandrina, vesnarinone y CAPE ⁽³¹¹⁾. La mayoría de estos compuestos son antioxidantes que actúan a través del bloqueo de la degradación de I κ B y de esta forma previenen la activación del NF- κ B.

Compuestos fenólicos (como los que contiene el extracto de M. indica) han presentado actividad anti-inflamatoria mediada por la inhibición de NF- κ B en varios tipos de células ⁽²¹⁹⁾. Estos metabolitos frecuentemente poseen actividad antioxidante, la cual puede convertirlos en inhibidores no específicos de NF- κ B por reducir las especies reactivas del oxígeno ⁽²²⁰⁾. Los polifenoles del té negro (Thea sinensis), derivados de teaflavina y catequina, han sido estudiados por su capacidad de suprimir la activación de NF- κ B en células RAW267.4 estimuladas con LPS ⁽²²²⁾. Los autores encontraron que uno de los derivados presentó una fuerte inhibición del NF- κ B en EMSAs. Esta actividad tuvo como consecuencia una reducción en la producción de ON y la ONSi en células estimuladas con LPS. La catequina también tuvo un potente efecto inhibitorio sobre la expresión de IKK α en células RAW264.7, lo que impidió la fosforilación del complejo I κ B-NF- κ B. Otros compuestos, tales como epigalocatequina-3-galato, presentó actividad inhibitoria sobre NF- κ B activado por FNT α en queratinocitos normales epidérmicos humanos y en células

de carcinoma epidérmico humano (A431) ⁽²²³⁾. Estos resultados sugieren que los compuestos fenólicos (como los derivados de catequina y epicatequina) incluidos en el extracto ⁽²⁹⁾ podrían ser los responsables de la inhibición del NF- κ B activado por FNT α en células 5.1 (Fig. 8) y Jurkat (Fig. 9) mostrados en el presente estudio. Estos resultados se corresponden con aquellos publicados por otros autores que evaluaron el efecto de numerosos extractos o compuestos aislados, a los que se les ha encontrado actividades antioxidante y(o) anti-inflamatorio, en estas líneas celulares ^(367, 368, 369, 370, 371, 372). Recientemente, un extracto de Cratoxylum cochinchinense fue evaluado en células Jurkat para demostrar sus propiedades antioxidantes las que fueron atribuidas a la mangiferina, compuesto mayoritario en dicho extracto ⁽³⁷³⁾.

Recientemente, el componente mayoritario del extracto de M. indica, la mangiferina, también bloqueó la activación del NF- κ B inducida por el FNT α y genes dependientes de NF- κ B como COX-2 e ICAM-1. Este efecto estuvo mediado por la inhibición de la activación de IKK y posterior bloqueo de la fosforilación y degradación de I κ B ⁽³⁷⁴⁾. Dicha inhibición está relacionada con la supresión de la fosforilación y degradación de I κ B α , la translocación nuclear de la sub-unidad p65 de NF- κ B y la fosforilación de p65. Estos autores encontraron además, que existen diferentes vías por las cuales mangiferina inhibe la activación de NF- κ B inducida por el FNT α . Esta involucra la interacción secuencial del receptor del FNT α con TRADD, TRAF2 y NIK, los que posteriormente activan IKK, y esta a su vez fosforila I κ B α . La activación de NF- κ B requiere de una fosforilación secuencial, una ubiquitinación y una degradación de I κ B α . Mangiferina bloquea la activación de IKK, seguida de la fosforilación de I κ B α y su degradación; lo que indica que el efecto de la mangiferina sobre el NF- κ B pudiera ser debido a la inhibición de la fosforilación y a la proteólisis de I κ B α . En este estudio también se atribuye este efecto

inhibidor de las cinasas a la acción antioxidante que presenta la mangiferina, teniendo en cuenta que la activación de NF- κ B y sus cinasas asociadas, como I κ B α (IKK), en muchos casos depende de la producción de EROs ⁽³⁷⁵⁾, estos compuestos antioxidantes, muchos de ellos presentes en el extracto de M. indica, pudieran ejercer su acción a través de sus potentes efectos secuestradores de EROs.

Además, en este estudio la mangiferina inhibió la fosforilación y translocación al núcleo de p65 inducido por FNT α , así como la activación de NF- κ B inducida por otros agentes pro-inflamatorios como PMA, ceramide y LPS. Esta xantona glicosilada, al igual que otros agentes antioxidantes conocidos, como n-acetilcisteína y pirrolidona ditiocarbamato, inhibe la generación de intermediarios reactivos de oxígeno inducidos por FNT. Ya que se conoce que los niveles intracelulares de GSH modulan los niveles de NF- κ B, en este estudio se comprobó que la mangiferina aumenta los niveles de GSH al menos dos veces más que los otros antioxidantes y que, al mismo tiempo, esta decreció los niveles de GSSG e incrementó la actividad de la catalasa ⁽³⁷⁴⁾. El extracto de M. indica, al ser un potente antioxidante, podría ejercer su acción de la misma manera que su componente mayoritario (mangiferina), a través de la inhibición de la fosforilación de I κ B α . Además, esta capacidad de mangiferina de inhibir NF- κ B e incrementar los niveles de GSH, al igual que el extracto de M. indica ⁽³²⁾, la convierten en un candidato prometedor para la terapia antioxidante y anti-inflamatoria.

El extracto de M. indica también contiene entre 0,03 y 0,08 % de Se ⁽²⁵⁷⁾. El Se, como ya se ha dicho, es un componente esencial de la familia de las enzimas GPx y tioredoxina reductasa, importantes enzimas antioxidantes que catalizan la reducción de hidroperóxidos producidos por especies oxidadas tales como superóxido y lipoperóxidos ⁽³⁷⁶⁾. Estas enzimas están involucradas en muchos procesos bioquímicos tales como la protección contra el estrés oxidativo y la regulación en la expresión de genes basadas en el proceso

redox ⁽³⁷⁷⁾. El Se también modula la actividad de NF- κ B en células T humanas tratadas con LPS y en células de adenocarcinoma de pulmón a través de un mecanismo diferente que involucra el estado redox de residuos cisteínicos específicos de NF- κ B y selenoproteínas, como tioredoxina ⁽³⁷⁸⁾. Además, el papel citoprotector de tioredoxina en modular el enlace al ADN de los factores transcripcionales tales como NF- κ B, AP-1, p53 y PEBP-2 coincide con la translocación incrementada de esta proteína al núcleo de las células sometidas a un estrés inflamatorio ^(379, 380). Los resultados del presente estudio sugieren que el extracto de M. indica pudiera también modular la activación del NF- κ B por el contenido de Se presente en el extracto. Como las concentraciones de Se en pacientes con artritis reumatoide son relativamente bajas ⁽³⁸¹⁾, y está demostrada tanto la importancia de la inhibición de la activación de NF- κ B como el efecto del extracto en modelos experimentales en esta patología (datos no mostrados), dicho extracto podría ser de utilidad como un suplemento de Se en estos pacientes.

La inhibición de NF- κ B puede ser útil además en el tratamiento de enfermedades agudas (como el choque séptico). El síndrome de choque séptico está asociado con una activación masiva del NF- κ B. Existen otras evidencias del papel que desempeña el NF- κ B durante la artritis reumatoide ⁽¹⁶⁴⁾ y la importancia del NF- κ B durante la enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej. enfermedad de Crohn). Otras enfermedades inflamatorias como el Alzheimer también involucran la activación de NF- κ B ⁽³⁸²⁾. El extracto de M. indica podría ser de interés terapéutico para desarrollar fármacos que sean capaces de interferir con la sobre-expresión de las citocinas pro-inflamatorias y la actividad de NF- κ B.

Los resultados de estos ensayos demuestran que el extracto de M. indica es un inhibidor específico de NF- κ B activado por FNT α y un supresor de la proliferación de células T

inducida por superantígeno. Estos resultados muestran las bases moleculares por las cuales el extracto ejerce sus efectos inmunomodulador y anti-inflamatorio.

Constituye un hallazgo científico importante el hecho de que el extracto de M. indica inhiba la actividad de unión de NF- κ B al ADN de líneas celulares específicas. Además, estos resultados indican que dicho extracto podría regular la expresión temprana de los genes del FNT α inducidos por los componentes estructurales de las bacterias (como en el caso del choque séptico inducido por LPS), a través de la regulación de NF- κ B.

Estos resultados evidenciaron una disminución significativa de la producción del FNT α tanto en modelos in vivo como in vitro, en presencia del extracto de M. indica y son consistentes con los efectos observados sobre la inhibición de la actividad de unión del NF- κ B e indican que dicho extracto puede regular la producción del FNT α mediante la inhibición de la actividad de unión al NF- κ B.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio, mediante el empleo de diferentes modelos de inflamación in vivo e in vitro, permiten concluir que, además del potente efecto antioxidante ya demostrado para el extracto, este posee actividad anti-inflamatoria y que contribuye de manera decisiva en esta acción farmacológica, su efecto regulador sobre la producción de citocinas proinflamatorias, como el FNT α , y del radical libre ON en macrófagos; así como su acción moduladora sobre la FLA₂, la biosíntesis de especies derivadas de la activación de la vía metabólica del AA (PGs y LTs), el NF- κ B (Fig. 10) y la proliferación de linfocitos T. Parte de estos efectos, probablemente, sean el resultado de la acción de las especies polifenólicas mayoritarias presentes en el extracto, y en particular, la que realiza la mangiferina. Aunque no debe descartarse el aporte que deben realizar a esta acción anti-inflamatoria los otros componentes presentes en el extracto, como los terpenoides, los ácidos grasos y los microelementos. Es importante destacar, que los

estudios realizados in vitro permitieron comprobar una mayor inhibición para el extracto de M. indica en relación con la mangiferina aislada de él, sobre el FNT α , los nitritos y la FLA₂. Esto podría justificarse por la contribución que al efecto anti-inflamatorio descrito realizan todos los componentes del extracto, acciones estas que la mangiferina por si sola no logra desarrollar al mismo nivel.

Como se ha visto anteriormente, recientes datos de publicaciones científicas demuestran que los extractos o compuestos derivados de plantas presentan actividades anti-inflamatorias importantes y muchas de sus acciones están relacionadas con la inhibición de la cascada del ácido araquidónico (tales como FLA₂, PGs y LTs), de radicales libres (como el ON) y de citocinas pro-inflamatorias (como el FNT α), por controlar fundamentalmente la expresión de genes de estas sustancias proinflamatorias relevantes involucradas en la génesis y el mantenimiento de la inflamación. Como se discutió anteriormente, muchos desórdenes inflamatorios como la sepsis, la artritis reumatoide y el asma están íntimamente asociadas con un desbalance de algunos de estos mediadores; así como con un exagerado influjo celular hacia los sitios inflamados. De hecho, la industria farmacéutica hace esfuerzos para identificar nuevas entidades moleculares, relevantes terapéuticamente, capaces de modular las respuestas activadas por estos mediadores. Estos agentes podrían ser útiles no solamente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, si no también para el control de otras enfermedades que presentan un origen inflamatorio, tales como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer, entre otras. Aunque algunos moduladores de estos mediadores (por ejemplo, bloqueadores selectivos del receptor de FNT α , inhibidores selectivos o no de COX-1 y 2, etc.) han sido empleados clínicamente, el uso de estos presenta algunas desventajas, especialmente referidas a su alto costo, importantes efectos adversos y ruta de administración (para algunos la terapia efectiva requiere de dos administraciones sub-cutáneas a la semana). En este contexto, el desarrollo de agentes

terapéuticos basado en compuestos derivados de plantas o sus extractos podrían tener beneficios. De este modo, usados solos o en combinación con otros fármacos anti-inflamatorios disponibles, ellos permitirían una reducción de los costos y(o) efectos adversos y, posiblemente podrían conducir a una elevación en la eficacia del tratamiento.

Las propiedades anti-inflamatorias del extracto acuoso de M. indica, obtenido en el Centro de Química Farmacéutica y demostradas por primera vez en el presente estudio, además de constituir un hallazgo novedoso, fundamentan científicamente el posible uso de dicho extracto como suplemento nutricional para el mejoramiento de la calidad de vida de diferentes grupos poblacionales.

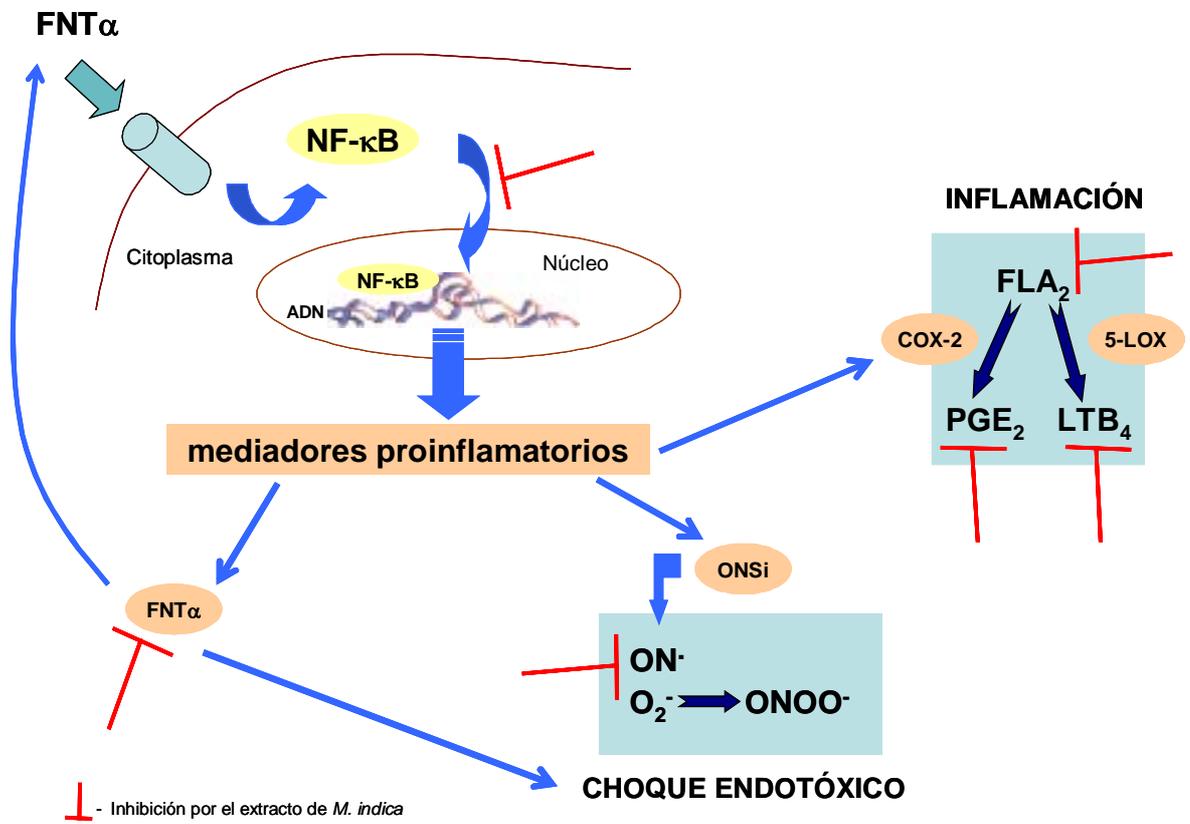


Figura 10. Mecanismos asociados al proceso inflamatorio y su modulación por el extracto acuoso de Mangifera indica L.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de Mangifera indica L., administrado por vía oral durante tres meses, produce una acción inhibitoria sobre los edemas plantares, y la producción del FNT α en sus exudados, inducidos por carragenano y LPS que son dependientes de la dosis.
2. El extracto acuoso de Mangifera indica L. inhibe la producción de la citocina proinflamatoria FNT α en un modelo murino de choque endotóxico inducido por LPS, que depende del tiempo de aplicación del extracto. Se comprobó que el extracto desarrolla esta acción a partir de una inhibición sobre la expresión del transcrito primario (ARNm) de dicha citocina.
3. El efecto anti-inflamatorio del extracto acuoso de Mangifera indica L. se explica, al menos en parte, por la inhibición que produce, con un efecto dependiente de la dosis utilizada, de la producción de la citocina proinflamatoria FNT α , el radical libre ON y los prostanoïdes PGE₂ y LTB₄ en macrófagos y microglia activados. La acción anti-inflamatoria del extracto también podría explicarse por la inhibición que ejerce sobre la FLA₂; así como la proliferación de linfocitos T.
4. La inhibición producida por el extracto acuoso de la corteza de Mangifera indica L. sobre la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B contribuye a explicar, a nivel molecular, las actividades biológicas atribuidas a dicho extracto.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Estudiar la acción del extracto de M. indica, tanto in vitro, como in vivo, sobre la producción de otras citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 e IL-8, entre otras.
2. Comprobar que el extracto no active, de algún modo, la biosíntesis de citocinas que participan en los mecanismos anti-inflamatorios, como IL-4 e IL-10.
3. Estudiar la acción directa del extracto en modelos in vivo sobre la producción de eicosanoides (PGs y LTs) y sobre las enzimas responsables de la formación de ellos (COX y LOX).
4. Profundizar en la acción del extracto sobre la vía metabólica L-arginina - óxido nítrico, determinar si ejerce alguna acción sobre la ONSc y esclarecer la acción in vitro e in vivo sobre la ONSi.
5. Explorar la participación de otros agentes involucrados en la respuesta inflamatoria (cininas, PAF, histamina, serotonina, AMPc, GMPc, sustancia P, etc.) como posibles blancos de la acción anti-inflamatoria y anti-nociceptiva del extracto de M. indica.
6. Evaluar la potencialidad del extracto de M. indica. en modelos experimentales de inflamación crónica, colitis ulcerativa, artritis reumatoide y modelos de neurodegeneración.
7. Investigar la posible interacción del extracto de M. indica. con otros factores de transcripción que desempeñan un papel importante en procesos inflamatorios e inmunológicos.
8. Desarrollar ensayos clínicos controlados con vistas a confirmar las acciones de este suplemento nutricional en patologías o desórdenes relacionados con el proceso inflamatorio, y comprobar si los efectos inhibitorios sobre los mediadores inflamatorios, se manifiestan en humanos tratados con este extracto de M. indica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ali H, Haribabu B, Richardson RM, Snyderman R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Adv Rheumatol* 81:1-28, 1997.
- 2 Garrison J. Histamina, bradiquinina, 5-hidroxitriptamina y sus antagonistas. En: Flórez J. *Farmacología humana*. (Ediciones Massons, S.A.). Barcelona. 565-587, 1992.
- 3 Thien FCK, Walters EH. Eicosanoids and asthma: an Update. *Prost Leuk and Essential Fatty Acids* 52:271-288, 1995.
- 4 Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthase in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70, 1993.
- 5 Xing Z, Jordana M, Gauldie J, Wang J. Cytokines and pulmonary inflammatory and immune diseases. *Histol Histopatol* 14:185-201, 1999.
- 6 Beutler B. The complex regulation and biology of TNF (cachectin). *Crit Rev Oncog* 2:9-18, 1990.
- 7 Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-452, 1992.
- 8 Brandtzaeg P, Waage A, Mollnes ET, Oktedalen O, Kierulf P. Severe human septic shock involves more than tumor necrosis factor. In *bacterial endotoxins: cytokine mediators and new therapies for sepsis*. Wiley-Liss, Inc. 25-42, 1991.
- 9 Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 92:164-169, 1999.
- 10 Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918, 1994.
- 11 Loll PJ. Structure of prostaglandin H2 synthase-1 (COX-1) and its NSAID binding sites. En: *New targets in inflammation. Inhibitors of COX-2 or adhesion molecules*. Kluwer Academic Dordrecht 13-21, 1996.
- 12 Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC and Manning AM. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol* 155:3538-3545, 1995.
- 13 Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387:620-624, 1997.
- 14 D'Ambrosio D, Ieliani A, Colantonio L, Clisi B, Pardi R and Sinigaglia F. Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today* 21:175-178, 2000.
- 15 Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Current Biology* 8:R19-R22, 1998.

-
- 16 Yamamoto Y and Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107:135-142, 2001.
 - 17 Marks R. Adverse side effects from the use of topical corticosteroids. En: *Topical corticosteroids*. (eds Maibach H, Surber Ch), Basel, Karger, 170-183, 1992.
 - 18 Campbell WB. Autacoides derivados de lípidos: Eicosanoides y factor activador plaquetario. En: *Bases farmacológicas de la terapéutica*. Octava edición. (eds. Goodman Gilman, A Rall, TW Nies AS Taylor P) México D.F. , Panamericana, pps. 588-623, 1991.
 - 19 Stevenson DD. Adverse reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Hypers* 18:773-798, 1998.
 - 20 Drazen J. Clinical pharmacology of leukotriene receptor antagonists and 5-lipoxygenase inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* 157:S233-S237, 1998.
 - 21 Garland LG, Hodgson ST. Inhibition of leukotriene production by inhibitors of lipoxygenation. En: *Advances in prostaglandin, tromboxane, and leukotriene research. Leukotrienes as mediators of asthma and inflammation: basic and applied research*. vol 22. (ed. Dahlén SE, Hedqvist P, Samuelsson B, Taylor WA, Fritsch J), New York, Raven Press Ltd, pps. 33-48, 1994.
 - 22 Gardiner PJ, Abram TS, Tudhope SR, Cuthbert NJ, Norman P, Brink C. Leukotriene receptors and their selectives antagonists. En: *Advances in prostaglandin, tromboxane, and leukotriene research. Leukotrienes as mediators of asthma and inflammation: basic and applied research*. vol 22. (ed. Dahlén SE, Hedqvist P, Samuelsson B, Taylor WA, Fritsch J), New York, Raven Press Ltd, pps. 49-63, 1994.
 - 23 Conner EM, Grisham MB. Inflammation, Free radicals and antioxidants. *Nutrition* 12:274-277, 1996.
 - 24 Penn AS. Inflammation. *Curr Opin in Neurol* 9:219-220, 1996.
 - 25 Bremner P, Heinrich M. Natural products as modulators of the NF- κ B-pathway. *J Pharm Pharmacol* 54:453-472, 2002.
 - 26 Guevara M, Riaño A, Alvarez A, Garrido G, Páez E, Delgado R. *Mangifera indica* L. uso etnomédico en Cuba. *Rev Cub Farmacia* 36 (Suplem. 2):166-167, 2002.
 - 27 Tamayo D, Mari E, González S, Guevara M, Garrido G, Delgado R, Marchioli R, Núñez AJ. Vimang as natural antioxidant supplementation in patients with malignant tumours. *Minerva Medica* 92 (Suppl.1):95-97, 2001.
 - 28 NAPRALERT. Facultad de Farmacia, Universidad de Illinois, Illinois, 2002
 - 29 Núñez-Sellés A, Vélez-Castro H, Agüero-Agüero J, González-González J, Naddeo F, De Simone F, Rastrelli L. Isolation and quantitative analysis of phenolic constituents, free sugars,

-
- fatty acids and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. *J Agric Food Chem* 50:762-766, 2002.
- 30 Center of Pharmaceutical Chemistry. Pharmaceutical compositions including a mixture of polyphenols, terpenoids, steroids, fatty acids, and microelements with antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, and anti-spasmodic properties. Patente 203/98; OCPI-Havana, Cuba, 2002.
- 31 Martínez G, Delgado R, Pérez G, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res* 14:424-427, 2000.
- 32 Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Davison GP, León-Fernández OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 42:565-573, 2000.
- 33 Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G and Núñez-Sellés AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 15:581-585, 2001.
- 34 Martínez G, Candelario-Jalil E, Giuliani A, León OS, Sam S, Delgado R, Núñez AJ. *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) reduces ischaemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the Gerbil brain. *Free Radical Res* 35:465-473, 2001.
- 35 Martínez G, Rodriguez HMA, Giuliani A, Nunez Selles AJ, Pons Rodriguez N, Fernandez OS, Re L. Protective effect of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) on the injury associated to hepatic ischemia reperfusion. *Phytother Res* 17:197-201, 2003.
- 36 García D, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J. Modulator effects of rat macrophages function by *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin. *Int Immunopharmacol* 2:797-806, 2002.
- 37 Cancino-Badias L, Leyva-González A, Garrido-Garrido G, Cossio-Ayala M, Prieto-González E. Vimang: Los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. *Rev Cub Invest Bioméd* 20:48-53, 2001.
- 38 Signore A, Annovazzi A, Corsetti F, Capriotti G, Chianelli M, De Winter F, Scopinaro F. Biological imaging for the diagnosis of inflammatory conditions. *BioDrugs* 16:241-259, 2002.
- 39 Rocha E, Silva M. A brief survey of the history of inflammation. *Agents and Actions* 43:86-90, 1994.
- 40 Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 64:843-850, 2002.
- 41 Venge P. Soluble markers of allergic inflammation. *Allergy* 49:1-8, 1994.
- 42 Fernández J and Esteban A. Detección de marcadores de inflamación ¿Es útil en alergia a medicamentos? *Alergol Inmunol Clin* 15:162-169, 2000.

-
- 43 DeMartino JA, Konteatis ZD, Siciliano SJ. Arginine 206 of the C5a receptor is critical for ligand recognition and receptor activation by C-terminal hexapeptide analogs. *J Biol Chem* 70:15966-15967, 1995.
- 44 Rojas-Tamariz I, Enriquez-Coronel G. Presentación de un caso clínico de mucopolisacaridosis tipo Hurler y revisión de la literatura. *Rev Mexicana Neuroc* 2:149-160, 2001.
- 45 Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314, 1994.
- 46 Howarth P, Rajakulasingam K, Feather I. Mediators and allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 21 (suppl 1):262-266, 1991.
- 47 Bochner BS, Udem BJ, Lichenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol* 12:295-335, 1994.
- 48 Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87:1-5, 2000.
- 49 Dikshit M. Pharmacology of autacoids. *Indian J Pharmacol* 32:S3-S14, 2000.
- 50 Proudfoot AE, Power CA, Rommel C, Wells TN. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin Immunol* 15:57-65, 2003.
- 51 Van Acker FAA, Voss HP, Timmerman H. Chemokines: structure, receptors, and functions. A new target for inflammation and asthma therapy? *Mediat Inflamm* 5:393-416, 1996.
- 52 Kubes P and Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol* 10:127-135, 2000.
- 53 Bylund J, Samuelsson M, Tarkowski A, Karlsson A, Colins LV. Immunostimulatory DNA induces degranulation and NADPH-oxidase activation in human neutrophils while concomitantly inhibiting chemotaxis and phagocytosis. *Eur J Immunol* 32:2847-2856, 2002.
- 54 Walsh GM. Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol* 8:28-33, 2001.
- 55 Becker RC. Markers of platelet activation and thrombin generation. *Cardiovasc Toxicol* 1:141-145, 2001.
- 56 Aplin AE, Howe A, Alahari SK, and Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263, 1998
- 57 Opal SM and DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162-1172, 2000.
- 58 Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 34:24s-33s, 2001.
- 59 Standiford TJ. Anti-inflammatory cytokines and cytokines antagonist. *Curr Pharm Design* 6:633-649, 2000.

-
- 60 Akbar AN, Lord JM and Salmon M. IFN- α and IFN- β : a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today* 21:337-341, 2000.
- 61 Liles WC, Van Voorhis WC. Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* 172:1573-1580, 1995.
- 62 Arai K, Tsuruta L, Watanabe S, Arai N. Cytokine Signal Networks and a new era in biomedical research. *Mol Cells* 7:1-12, 1997.
- 63 Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:413-421, 2002.
- 64 Molet S, Furukawa K, Maghazechi A, Hamid Q, Giaid A. Chemokine and cytokine-induced expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1. *J Allergy Clin Immunol* 105:333-338, 2000.
- 65 Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorezetti BB, Ferreira SH. Cytokines-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol* 115:668-678, 1995.
- 66 Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966:290-303, 2002.
- 67 Escoubet-Lozach L, Glass CK, Wasserman SI. The role of transcription factors in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110:553-564, 2002.
- 68 Tracey KJ, Cerami A. The biology of cachetin/tumor necrosis factor. In Habenicht A (ed) *Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokines*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp 356-365, 1990.
- 69 Ghezzi P. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of human diseases. *Int J Immunopathol and Pharmacol* 5:131-134, 1992.
- 70 Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39: 237-46, 2002.
- 71 Leininger MT, Portocarrero CP, Bidwell CA, Spurlock ME, Houseknecht KL. Leptin expression is reduced with acute endotoxemia in the pig: correlation with glucose, insulin, and insulin like growth factor-1 (IGF-1). *J Interferon Cytokine Res* 20: 99-106, 2000.
- 72 Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and TNF and the treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 163:1177-1184, 1991.
- 73 Bertini R, Delgado R, Faggioni R, Gascon MP, Ythier A, Ghezzi P. Urinary TNF-binding protein protects mice against the lethal effect of TNF and endotoxic shock. *Eur Cytokine Network* 4:39-42, 1993.
- 74 Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725, 1996.

-
- 75 Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445, 1993.
- 76 Morcillo E, Cortijo J. Mediadores celulares III. Péptidos, cininas, otros mediadores. En: Flórez J. *Farmacología humana*. (Ediciones Masson, SA.). Barcelona. pps. 301-312, 1992.
- 77 Gao GC, Wey ET. Inhibition of substance P induced vascular leakage in rat by N-acetyl-neurotensin-(8-13). *Regul Pept* 58:117-121, 1995.
- 78 Rosengren S, Bong GW, Frestein GS. Anti-inflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor. Decreased neutrophil accumulation and vascular leakage. *J Med* 154:5444-5451, 1995.
- 79 Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 115:1265-1275, 1995.
- 80 Downey GP, Fukushima T, Fialkow L. Intracellular signalling in neutrophil priming and activation. *Cell Biol* 6:345-356, 1995.
- 81 McInnes IB, Leung B, Wei XQ, Gemmell CC, Liew FY. Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 160: 308-315, 1998.
- 82 Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci A. Tumor necrosis factor α induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2365-2368, 1989.
- 83 Song HY, Régnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9792-9796, 1997.
- 84 Kim YH, Ko WS, Ha MS, Lee CH, Choi BT, Kang HS, Kim HP. The production of nitric oxide and TNF-alpha in peritoneal macrophages is inhibited by *Dichroa febrifuga* Lour. *J Ethnopharmacol* 69:35-43, 2000.
- 85 Burda S and Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49:2774-2778, 2001.
- 86 Tsai SH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of TNF α -mediated NF kappa B activity by myceritin and other flavonoids through downregulating the activity of IKK in ECV304 cells. *J Cell Biochem* 74: 606-615, 1999.

-
- 87 Park YC, Rimbach G, Salioru C, Valacchi G, Packer L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* 465:93-97, 2000.
- 88 Middleton E, Jr. and Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol* 43:1167-1179, 1992.
- 89 Manthey JA, Grohmann K, Montanari A, Ash K, Manthey CL. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *J Nat Prod* 62:441-444, 1999.
- 90 Jaattela M. Biological activities and mechanisms of action of TNF- α /cachectin. *Lab Invest* 64:724-742, 1991.
- 91 Darnay BG, and Aggrawal BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol* 61:559-566, 1997.
- 92 Henderson WR. Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 143:S86-S90, 1991.
- 93 Van der Vusse D, Glatz JFC, Stam HCG, Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72:881-940, 1992.
- 94 Prescott SM. A thematic series on phospholipases. *Am Soc Biochem Mol Biol* 274:15043, 1997.
- 95 Waite M. Phospholipases. En: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (eds Vance DE, Vance BV) New York, Elsevier, pps. 211-236, 1996.
- 96 Glaser KB. Regulation of phospholipase A₂ enzymes: selective inhibitors and their pharmacological potential. *Adv Pharmacol* 32:31-66, 1995.
- 97 Cummings S, McHowat J and Schnellmann RG. Phospholipase A₂s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 294:793-799, 2000.
- 98 Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:175-189, 1999.
- 99 Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Martino V, Gentile M, Calabrese C, Palumbo C, Marone G. Secretory phospholipases A₂ induce β -glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 162:4908-4915, 2000.
- 100 Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Functional coupling between secretory phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7951-7956, 1998.
- 101 Kramer RM and Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺ sensitive cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *FEBS Lett* 410:49-53, 1997.

-
- 102 Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D1 macrophages via sphingomyelin synthesis. *J Biol Chem* 272:20373-20377, 1997.
- 103 Dennis E. Diversite de group types, regulation and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 269:13057-13060, 1994.
- 104 Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I. Regulatory functions of Phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 17:225-283, 1997.
- 105 Rosenthal MD, Rzigalinski BA, Blackmore PF, Fracson RC. Cellular regulation of arachidonate mobilization and metabolism. *Prost Leuk and Essential Fatty Acids* 52:93-98, 1995.
- 106 Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: Constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 79:691-705, 1998.
- 107 Gerritsen ME. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiov Res* 32: 720-732, 1996.
- 108 Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 16:181-206, 1996.
- 109 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271:33157-33160, 1996.
- 110 Jouzeau J, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs* 53:563-582, 1997.
- 111 Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120, 1998.
- 112 Piomelli D. Arachidonic acid. En: *Psychopharmacology: the fourth generation of progress.* (eds Bloom FE and Kupfer DJ.) New York, Raven Press Ltd, pp. 595-607, 1995.
- 113 Rita M, Young I. Eicosanoids and the immunology of cancer, *Cancer and Metastasis Rev* 13:337-348, 1994.
- 114 Sharma S, Sharma SC. An update on eicosanoids and inhibitors of cyclooxygenase enzyme systems. *Indian J Exp Biol* 35:1025-1031, 1997.
- 115 O'Banion K. Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13:45-82, 1999.
- 116 Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Med Cell Sign* 12:243-259, 1995.
- 117 Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM. Structure and mechanism of lipoygenases. *Biochemie* 79:629-636, 1997.

-
- 118 Serhan CN, Drazen JM. Antiinflammatory potential of lipoxygenase-derived eicosanoids: A molecular switch at 5 and 15 positions. *J Clin Invest* 99:1147-1148, 1997.
- 119 Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway, *Am J Respir Crit Care Med* 157:S227-S232, 1998.
- 120 Peters-Golden M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. *Clin Exp Allergy* 28:1059-1065, 1998.
- 121 Mayatepek E, Hoffmann GF. Leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatric Res* 37:1-9, 1995.
- 122 Nicosia S. Receptors for cysteinyl-leukotrienes: targets for new drugs. En: Novel inhibitors of leukotrienes. Folco G, Samuelsson B, Murphy RC eds. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pps. 83-100, 1999.
- 123 Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Mi DS, SAWYER n, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hook SB, Hosfield E, Wilhams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399:789-793, 1999.
- 124 Murphy RC and Hankin JA. Metabolism of leukotrienes and formation of new leukotriene structures. En: Novel inhibitors of leukotrienes. Folco G, Samuelsson B, Murphy RC eds. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pps. 63-82, 1999.
- 125 Hedqvist PO and Lindbom LJO. Physiological and pathophysiological activities of leukotrienes. En: Novel inhibitors of leukotrienes. Folco G, Samuelsson B, Murphy RC eds. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pps. 125-137, 1999.
- 126 Folco G. Inhiitors of leukotrienes: an overview. En: Novel inhibitors of leukotrienes. Folco G, Samuelsson B, Murphy RC eds. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pps. 205-214, 1999.
- 127 Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77:147-161, 1995.
- 128 Beyer RE. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Rad Biol Med* 8:545-565, 1990.
- 129 Sevanian A, Nordenbrand K, Ernester L and Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation. The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Rad Biol Med* 8:145-152, 1990.
- 130 Kohen R, Nyska A. Oxydation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30:620-650, 2002.

-
- 131 Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction. Evaluation of its role in nitrate and nitric oxide generation in anoxic tissue. *Biochemistry* 42:1150-1159, 2003.
- 132 Blake DR, Rallen RE, Lunec J. Free radicals in biological system- a review oriented to inflammatory process. *Br Med Bull* 45:371-385, 1987.
- 133 Yamamoto S. Enzymatic lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenase. *Free Rad Biol Med* 10:149-159, 1991.
- 134 Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59:1428-1459, 2002.
- 135 Hollan S. Free radicals in health and disease. *Haematologia* 26:177-189, 1995.
- 136 Kimura K. Mechanisms of active oxygen species reduction by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Int J Biochem Cell Biol* 29:437-446, 1997.
- 137 Vapaatalo H. Free radicals and anti-inflammatory drugs. *Med Biol* 64:1-7, 1986.
- 138 Halliwell B, Hoult JR and Blake DR. Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 2:2867-2873, 1988.
- 139 Abramson S, Korchack H, Ludewing R, Edelson H, Weissmann G. Modes of action of aspirin-like drugs *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7227-7231, 1985.
- 140 Dinis TC, Madeira VM and Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315:161-169, 1994.
- 141 Pavlovich D, Uzunova P, Galabova Y, Peneva V, Socolova Z, Koraccecic D, Tsanev R, Petty MA, Dow J, Grisa JM and De Jong W. Effect of a cardioselective α -tocopherol analogue on reperfusion injury in rats induced by myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 192:383-388, 1991.
- 142 Braughler JM. Lipid peroxidation-induced inhibition of γ -aminibutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J Neurochem* 44:1282-1288, 1985.
- 143 Hall DE. Novel inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation for neurodegenerative disorders. *Ann Nerol* 32:137-142, 1992.
- 144 Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6:347-373, 2000.
- 145 Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today* 19:556-561, 1998.
- 146 Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 17:7-23, 1998.
- 147 Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230, 1999.

-
- 148 Balligand JL, Ungureanu-longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 269:27580-27588, 1994.
- 149 Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145:201-227, 1992.
- 150 Rojas A, Padrón J, Caveda, Palacios M, Moncada S. Role of nitric oxide pathway in the protection against lethal endotoxemia afforded by low doses of lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 191:441-446, 1993.
- 151 Salvemini D, Seibert K, Marino MH. PG release, as a consequence of NO-driven COX activation contributes to the proinflammatory effects of NO. *Drugs News Perspect* 4:204-219, 1996.
- 152 Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 9:138-142, 1997.
- 153 Li J, Billiar TR. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 276:G1069-G1073, 1999.
- 154 Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang O, Shapiro RA, Morris SM Jr, Billiar TR, Geller DA. Multiple NF-kappa B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273:15148-15156, 1998.
- 155 Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 41:1141-1151, 1998.
- 156 Clough GF. Role of nitric oxide in the regulation of microvascular perfusion in human skin *in vivo*. *J Physiol (Lond)* 516:549-557, 1999.
- 157 Kronche KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113:147-156, 1998.
- 158 Maxwell AJ, Cooke JP. The role of nitric oxide in atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 10:277-286, 1999.
- 159 Sanders SP. Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? *Am J Resp Cell Mol Biol* 21:147-149, 1999.
- 160 Schaffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* 165:262-267, 1999.
- 161 Leonard N, Bishop AE, Polak JM, Talbot IC. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *J Clin Pathol* 51:750-753, 1998.

-
- 162 Fox DA. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis. Inhibition of tumour necrosis factor. *Arch Intern Med* 160:437-444, 2000.
- 163 Boone DL, Lee EG, Libby S, Gibson PJ, Chien M, Chan F, Madonia M, Burkett PR, and Ma A. Recent advances in understanding NF- κ B regulation. *Inflamm Bowel Dis* 8:201–212, 2002.
- 164 Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649–683, 1996.
- 165 Chen F, Castranova V, Shi X, and Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappa B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45:7–17, 1999.
- 166 Karin M and Ben-Neriah. Phosphorilation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663, 2000.
- 167 Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, and Okudaira H. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappa B and CBF1. *Am J Pathol* 152:793–803, 1998.
- 168 Rahman A, Anwar KN, True AL, and Malik AB. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol* 162:5466–5476, 1999.
- 169 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB and Baldwin AS, Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappa B kinase activity and nuclear factor kappa B DNA binding. *J Biol Chem* 274:31868–31874, 1999.
- 170 Baldwin AS, Jr. The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 107:3-6, 2001.
- 171 Zandi E, Chen Y and Karin M. Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappa B-bound substrate. *Science* 281:1360–1363, 1998.
- 172 Saitoh T, Nakano H, Yamamoto N, Yamaoka S. Lymphotoxin eta receptor mediates NEMO-independent NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 532:45-51, 2002.
- 173 Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9:1586–1597, 1995.
- 174 Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS. NF-kappa B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13859–13864, 1998.
- 175 Han ZN, Boyle DL, Manning AM and Firestein GS. AP-1 and NF-kappa B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 28:197–208, 1998.
- 176 Aupperle KR, Bennett BL, Boyle DL, Tak PP, Manning AM, Firestein GS. NF- κ B regulation by I κ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 163:427–433, 1999.

-
- 177 Polgár A, Brózik M, Tóth S, Holub M, Hegyi K, Kádár A, Hodinka L, Falus A. Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 6:13-18, 2000.
- 178 Kotzin BL, Falta MT, Crawford F, Rosloniec EF, Bill J, Marrack P, and Kappler J. Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci* 97:291-296, 2000.
- 179 Amital H, Swissa M, Bar-Dayana Y, Buskila D, Shoenfeld Y. New therapeutic avenues in autoimmunity. *Res Immunol* 147:361-376, 1996.
- 180 Mantovani A, Merteelsman R, Schreiber H, Feldmann M, Mihich E. Selected aspects of the immunopharmacology of cytokines. En: *Pharmacological sciences perspectives for research and therapy in the late 1990s*, (eds. Cuello A, Coiller B) Basel, Birkhauser Verlag, 373-380, 1995.
- 181 Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck* 23: 409-425, 2001.
- 182 English D, Brindley DN, Spiegel S, Garcia JGN. Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim Biophys Acta* 1582:228-239, 2002.
- 183 Han Y-P, Tuan T-L, Wu H, Hughes M and Garner WL. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 114:131-139, 2000.
- 184 Nie D, Tang K, Diglio C, and Honn KV. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 95:2304-2311, 2000.
- 185 Jackson JR, Bolognese B, Mangar CA, Hubbard WC, Marshall LA, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other lipid mediators in in-inflammatory angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1392:145, 1998.
- 186 Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y, Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y, and Nishikawa S-I. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 96:546-553, 2000.
- 187 Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:655-677, 1995.
- 188 Videla S, García-Lafuente A, Antolín M, Vilaseca J, Guarner Fo, Crespo E, González G, Salas A and Malagelada JR. Antitumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. *J Pharmacol Exp Ther* 287:854-859, 1998.
- 189 Liew FY, McInnes IB. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol* 38:887-890, 2001.

-
- 190 Gerlag DM, Ransone L, Tak PP, Han Z, Palanki M, Barbosa MS, Boyle D, Manning AM, and Firestein GS. The effect of a T cell-specific NF- κ B inhibitor on *in vitro* cytokine production and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 165:1652–1658, 2000.
- 191 Locigno R, Antoine N, Bours V, Daukandt M, Heinen E, and Castronovo V. TNP-470, a potent angiogenesis inhibitor, amplifies human T lymphocyte activation through an induction of nuclear factor- κ B, nuclear factor-AT, and activation protein-1 transcription factors. *Lab Invest* 80:13–21, 2000.
- 192 Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50:515-596, 1998.
- 193 Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A. Topical steroids- a new approach after 50 years. *Med Sci Monit* 7:539-544, 2001.
- 194 Barnes PJ, Adcock I. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 14:436-441, 1993.
- 195 Jares E, Pignataro O. Mecanismos moleculares de acción de los corticoides Molecular mechanisms of corticosteroids. *AAIC* 33:9-21, 2002.
- 196 Talley JJ. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *Exp Opin Ther Patents* 7:55-62, 1997.
- 197 Frolich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *TiPS* 18:30-34, 1997.
- 198 Laporte JR, Bosch M, Agustí A, Arnau JM, Capellà D, Diogène E, Figueras A, Ibáñez L, Llop R, Pedrós C, Vallano A, Vidal X. Experiencia inicial de toxicidad de los AINE inhibidores de la COX-2. *Butlletí Groc* 13:17-20, 2000.
- 199 Chiou GCY, Liu SXL. Pulmonary-allergy, dermatological, gastrointestinal and arthritis. Novel, non-traditional, non-steroidal, anti-inflammatory agents. *Exp Opin Ther Patents* 6:41-56, 1996.
- 200 Cronstein BN. A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: Adenosine release at inflamed sites. *J Invest Med* 43:57-59, 1995.
- 201 Tak PP and Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107:7-11, 2001.
- 202 Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Reum* 44:1897-1907, 2001.
- 203 Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ and Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappa B, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1585–1592, 1998.

-
- 204 van Den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, vanDeventer SJ, Peppelenbosch MP. Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach. *J Immunol* 164:3353–3359, 2000.
- 205 Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Loek H, Strober W, Buschenfelde KH. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann NY Acad Sci* 859:149–159, 1998.
- 206 Mattson MP and Camandola S. NF-κB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 107:247-254, 2001.
- 207 Collins T and Cybulsky MI. NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107:255-264, 2001.
- 208 Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-κB by sodium-salicylate and aspirin. *Science* 265:956-959, 1994.
- 209 de las Heras B, Navarro A, Díaz-Guerra MJ, Bermejo P, Castrillo A, Boscá L, Villar A. Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-κB by andalusol. *Br J Pharmacol* 128:605-612, 1999.
- 210 Castrillo A, de las Heras B, Hortelano S, Rodríguez B, Villars A, Boscá L. Inhibition of the nuclear factor κB (NF-κB) pathway by tetracyclic kaurene diterpenoids in macrophages. *J Biol Chem* 276:15854-15860, 2001.
- 211 Hwang BY, Lee J-H, Koo TH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. Kaurane diterpenoids from *Isodon japonicus* inhibited nitric oxide and prostaglandin E2 production and NF-κB activation in LPS-stimulated macrophage RAW264±7 cells. *Planta Med* 67:406-410, 2001.
- 212 Ojo-Amaize EA, Kapahi P, Kakkanaiah VN, Takahashi T, Shalom-Barak T, Cottam HB, Adesomoju AA, Nchekwube EJ, Oyemade OA, Karin M, Okogun JI. Hypoestoxide, a novel anti-inflammatory natural diterpene, inhibits the activity of IκB kinase. *Cell Immunol* 209:149-157, 2001.
- 213 Beekman AC, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N, Konings AWT, Wikstrom HV, Schmidt TJ. Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. *J Nat Prod* 60:252-257, 1997.
- 214 Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl, HL, Merfort I, Schmidt T J. Inhibition of transcription factor NF-κB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 7:2343-2352, 1999.
- 215 Kwok BHB, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IκB kinase. *Chem Biol* 8:759-766, 2001.

-
- 216 Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear factor- κ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11557-11562, 2001.
- 217 Dirsch VM, Kierner AK, Wagner H, Vollmar AM. The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Pharmacol* 336:211-217, 1997.
- 218 Manna SK, Sah NK, Newman RA, Cisneros A, Aggarwal BB. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, and c-Jun NH₂-terminal kinase. *Cancer Res* 60:3838-3847, 2000.
- 219 Surh Y-J, Chun K-S, Cha H-H, Han SS, Keum Y-S, Park K-K, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 480-481:243-268, 2001.
- 220 Musonda CA, Chipman JK. Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF- κ B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 19:1583-1589, 1998.
- 221 Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164:6509-6519, 2000.
- 222 Pan M-H, Lin-Shiau S-Y, Ho C-T, Lin J-H, Lin J-K. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down regulation of I κ B kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol* 59: 357-367, 2000.
- 223 Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 376:338-346, 2000.
- 224 Chen Y-C, Shen S-C, Chen L-G, Lee TJ-F, Yang L-L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* 61:1417-1427, 2001.
- 225 Bork PM, Bacher S, Schmitz ML, Kaspers U, Heinrich M. Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF- κ B. *Planta Med* 65:297-300, 1999.
- 226 Pan M-H, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem Pharmacol* 60:1665-1676, 2000.

-
- 227 Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 20:7597-7609, 2001.
- 228 Saliou C, Rihn B, Cillard J, Okamoto T, Packer L. Selective inhibition of NF- κ B activation by the flavonoid hepato-protector silymarin in HepG2. *FEBS Lett* 440:8-12, 1998.
- 229 Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 163:6800-6809, 1999.
- 230 Murase T, Kume N, Hase T, Shibuya Y, Nishizawa Y, Tokimitsu I, Kita T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscl Throm Vasc Biol* 19:1412-1420, 1999.
- 231 Natarajan K, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of NF- κ B, degradation of I κ B α , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch Biochem Biophys* 352:59-70, 1998.
- 232 Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9090-9095, 1996.
- 233 Ye J, Ding M, Zhang X, Rojanasakul Y, Shi X. On the role of hydroxyl radical and the effect of tetrandrine on nuclear factor- κ B activation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Ann Clin Lab Sci* 30:65-71, 2000.
- 234 Wang J-Y, Guo J-S, Li H, Liu S-L, Zern MA. Inhibitory effect of glycyrrhizin on NF- κ B binding activity in CCl₄ - plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats. *Liver* 18:180-185, 1998.
- 235 Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol* 53:425-432, 2001.
- 236 Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 442:89-94, 1999.
- 237 Wei Z, Peng Q, Lau BHS, Shah V. *Ginkgo biloba* inhibits hydrogen peroxide-induced activation of nuclear factor kappa B in vascular endothelial cells. *Gen Pharmacol* 33:369-375, 1999.
- 238 Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang X-J, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowicka H, Charbonnet RM, Clark DA, Miller MJS. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. *Aliment Pharmacol Ther* 12:1279-1289, 1998.

-
- 239 Cho K-J, Yun C-H, Yoon D-Y, Cho Y-S, Rimbach G, Packer L, Chung A-S. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 168:64-71, 2000.
- 240 Roig JT. *Plantas Aromáticas y Venenosas de Cuba*. Segunda Edición. Editorial Científico-Técnica. La Habana, p. 610, 1988.
- 241 Chopra RN. *Indigenous drugs of India. Their medical and economic aspects*. The Art Press, Calcutta, India, 1933.
- 242 Singh YN. Traditional Medicine In Fiji: Some herbal folk cures used by Fiji indians. *J Ethnopharmacol* 15:57-88, 1986.
- 243 Muanza DN, Kim BW, Euler KI, Williams L. Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire. *Int J Pharmacog* 32:337-345, 1994.
- 244 Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AJ. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 61:57-65, 1998.
- 245 Le Grand A. Anti-infectious phytotherapy of the Tree-Savannah, Senegal (Western Africa) Iii: a review of the phytochemical substances and anti-microbial activity of 43 species. *J Ethnopharmacol* 25:315-338, 1989.
- 246 Chhabra SC, Mahunnah RLA, Mshiu EN. Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. I. Pteridophytes and angiosperms (Acanthaceae to Canellaceae). *J Ethnopharmacol* 21:253-277, 1987.
- 247 Coe FG, Anderson J. Screening of medicinal plants used by the Garifuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. *J Ethnopharmacol* 53:29-50, 1996.
- 248 Ponce-Macotella M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon. *In vitro* anti-giardiasis activity of plant extracts. *Rev Invest Clin* 46:343-347, 1994.
- 249 Awe SO, Olajide OA, Oladiran OO, Makinde JM. Antiplasmodial and antipyretic screening of *Mangifera indica* extract. *Phytotherapy Res* 12: 437-438, 1998.
- 250 Kambu K, Tona L, Kaba S, Cimanga K, Mukala N. Antispasmodic activity of extracts proceeding of plant antidiarrheic traditional preparations used in Kinshasa, Zaire. *Ann Pharm Fr* 48:200-208, 1990.
- 251 Aderibigbe AO, Emudianughe TS, Lawal BAS. Evaluation of the antidiabetic action of *Mangifera indica* in mice. *Phytother Res* 15:456-458, 2001.
- 252 Makare N, Bodhankar S, Rangari V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 78:133-137, 2001.

-
- 253 Garrido G, Cancino L, Quintero G, Alvarez X, Núñez Sellés AJ. QF-808: Ames and Micronuclei Assays in mouse bone marrow. *Memorias X Congr. Latinoam. Toxicol.* Habana, Nov. 1998. p.161.
- 254 Gámez R, Mas R, Arruzazabala ML, Noa M. Estudios de Toxicidad por Dosis Unicas del VIMANG en roedores: Ratas Sprague Dawley y Ratones OF-1. Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, La Habana, 2001. 134 pp.
- 255 Gámez R, Más R, Noa M, Menéndez R, Arango E, González J, Mendoza N, García H, Rodríguez Y, Goicoechea E, Mendoza S, González R. Estudio de la Toxicidad Subcrónica Oral (90 días) del VIMANG en Ratas Sprague Dawley. Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, 2002. 40 pp.
- 256 Rodríguez MD, Leal F, González J, García H, Goicoechea E, Guerrero S, Mendoza S, González R. Estudio teratogénico del extracto de la corteza de *Mangifera indica* L. (Vimang). Informe Técnico, Centro de Productos Naturales, 2002. 25 pp.
- 257 Martínez-Sánchez G, Delgado-Hernández R, Garrido-Garrido G, Guevara-García M, García-Rivera D, Paez-Betancourt E, Nuñez-Sellés A. Vimang. Nuevo producto natural antioxidante. Mitos y realidades de la terapia antioxidante. CQF-MINSAP, Combinado Poligráfico “Alejo Carpentier”, Ciudad de La Habana, 2003, p. 16.
- 258 Boughton-Smith NK, Deakin AM, Follenfant RL, Whittle BJ and Garland LG. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 110:896-902, 1993.
- 259 Escrig V, Ubeda A, Ferrandiz ML, Darias J, Sanchez JM, Alcaraz MJ and Paya M. Variabilin: A dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *J Pharmacol Exp Ther* 282:123-131, 1997.
- 260 García-Pastor P, Randazzo A, Gómez-Paloma L, Alcaraz MJ, Payá M. Effects of Petrosaspongiolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and chronic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 166-172, 1999.
- 261 Díaz-Lanza AM, Abad-Martínez MJ, Fernández-Matellano L, Recuero-Carretero C, Villaescusa-Castillo L, Silván-Sen AM, Bermejo-Benito P. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their *in vitro* anti-inflammatory activity. *Planta Med* 67:219-223, 2001.
- 262 Hulkower KI, Pollock JS, Walsh RE, Huang R, Otis ER, Brooks CD, Bell RL. Leukotrienes do not regulate nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55:145-149, 1996.

-
- 263 Star RA, Rajora N, Huang J, Chavez R, Catania A, Lipton JM. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by α -MSH. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8016-8020, 1995.
- 264 Corradin SB, Manuel J, Donini SD, Quattrocchi E, Ricciardi-Castagnoli P. Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells. *Glia* 7:255-262, 1993.
- 265 Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D, Baron B, Lipton JM, Catania A. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* 63:740-745, 1998.
- 266 Aggarwal BB, Khor WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel J, Bringman S, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol Chem* 260:2345-2354, 1985.
- 267 Azab AN, Kaplanski J. A reduction of tumor necrosis factor- α in paw exudate of lypopolysaccharide treated rats by nimeslide. *Life Sci* 68:1667-1675, 2001.
- 268 Delgado R, Demitri MT, Carlin A, Meazza C, Villa P, Lipton JM, Catania A. Inhibition of systemic inflammation by central action of the neuropeptide α -MSH. *Neuroimmunomodulation* 6:187-192, 1999.
- 269 Sierbert PD, Chenchik A. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extract method which greatly reduces DNA contamination. *Nucleic Acids Res* 21:2010-2020, 1993.
- 270 Rajora N, Boccoli G, Burns D, Sharma S, Catania A, Lipton JM. α -MSH modulates local and circulating TNF α in experimental brain inflammation. *J Neurosci* 17:2181-2186, 1997.
- 271 Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7:349-360, 1993.
- 272 Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB and Clark IA. *In vivo* induction of nitrite/nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1 implies a role of nitric oxide in cytokine-induced malarial cell-mediated immunity and pathology. *Infect Immunol* 60:3725-3730, 1992.
- 273 Rodriguez MS, Thompson J, Hay RT, Dargemont C. Nuclear retention of IkappaB α protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274:9108-9115, 1999.
- 274 Macho A, Blázquez MV, Navas P, Muñoz E. Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require *de novo* gene transcription and AP-1. *Cell Growth Differ* 9:277-286, 1998.
- 275 Muñoz E, Courtois G, Veschambre P, Jalinot P, Israel A. Tax induces nuclear translocation of NF- κ B through dissociation of cytoplasmic complexes containing p105 or p100 but does not induce degradation of I kappa B α /MAD3. *J Virol* 68:8035-8044, 1994.

-
- 276 Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez AJ and Morales MA. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Phytother Res* 15:18-21, 2001.
- 277 Cechinel-Filho V, Yunes RA. Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. *Química Nova* 21:99-105, 1998.
- 278 Rouillard F, Thiais A, Saint-Denis J. Cosmetic or Pharmaceutical compositions containing, as active ingredient, Mangiferine or its derivatives, in pure form or in plant extracts. United State Patent. Patent Number: 5,824,320, 1998.
- 279 Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy* 42:443-451, 1996.
- 280 Hsu MF, Raung SL, Tsao LT, Lin CN, Wang JP. Examination of the inhibitory effect of norathyriol in formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced respiratory burst in rat neutrophils. *Free Radic Biol Med* 23:1035-1045, 1997.
- 281 Wang JP, Ho TF, Lin CN, Teng CM. Effect of norathyriol, isolated from *Tripterospermum lanceolatum*, on A23187-induced pleurisy and analgesia in mice. *Naungn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350: 90-95, 1994.
- 282 Swingle KF, Bell RL, Moore GG. Anti-inflammatory activity of antioxidants. (editor. Rainsford KD). *Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs*. CRC Press, Boca Ratón, F.L. 106-26, 1985.
- 283 Calixto JB, Santos ARS, Cechinel-Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 18: 225-58, 1998.
- 284 Kourounakis AP, Galanakis D, Tsiakitzis K, Rekkas AE and Kourounakis PN. Synthesis and pharmacological evaluation of novel derivatives of anti-inflammatory drugs with increased antioxidant and anti-inflammatory activities. *Drug Dev Res* 47:9-16, 1999.
- 285 Cholbi R, Ferrándiz ML, Terencio MC, De Rosa S, Alcaraz MJ, Payá M. Inhibition of phospholipase A2 activities and some inflammatory responses by the marine product ircinin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354:677-683, 1996.
- 286 Schwemmer M, Aho H, Michel J-B. Interleukin-1b-induced type IIA secreted phospholipase A₂ gene expression and extracellular activity in rat vascular endothelial cells. *Tissue & Cell* 33: 233-240, 2001.
- 287 Valdés Rodríguez YC, Bilbao Díaz M, León Álvarez JL y Merchán González F. Origen e importancia de la fosfolipasa A₂ de secreción. *Rev Cubana Farm* 36:121-128, 2002.

-
- 288 Michael C. Seeds, David F. Jones, Floyd H. Chilton, David A. Bass. Secretory and cytosolic phospholipases A are activated during TNF priming of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1389:273–284, 1998.
- 289 Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Gunasegaran R, Payá M and Alcaraz MJ. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity *Biochemical Pharmacology* 53:733-740, 1997.
- 290 Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 47:997-1029, 1978.
- 291 Piper PJ. Formation and actions of leukotrienes. *Physiol Rev* 64:744-761, 1984.
- 292 Smith MJH, Ford-Hutchinson AW, Elliot PNC and Bolam J. Prostaglandin in the anti-inflammatory activity of a human plasma fraction in carrageenan-induced paw oedema in the rat. *J Pharm Pharmacol* 26:692, 1974.
- 293 Wang LM and Mineshita S. Preventive effects of Unsei-in and Oren-gedoku-to, chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *J Pharm Pharmacol* 48:327-331, 1996.
- 294 Corrêa CR and Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. *Br J Pharmacol* 110:193-198, 1993.
- 295 Décarie A, Adam A and Couture R. Effects of captopril and Icatibant on bradikinin (BK) and des[Arg9]BK in carrageenan-induced edema. *Peptides* 17:1009-1015, 1996.
- 296 Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models inflammation. *Free Radic Biol Med* 24:450-459, 1998.
- 297 Lin YL and Lin JK. (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcriptional factor nuclear factor κ B. *Mol Pharmacol* 52:465-472, 1997.
- 298 Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Rad Res* 33:635-641, 2000.
- 299 Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of the catechins. *Planta Med* 66:444-447, 2000.
- 300 Martínez-Sánchez G. Caracterización de los efectos biológicos del extracto de *Mangifera indica* L. (QF808). Un antioxidante multifuncional. Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de La Habana-IFAL, Ciudad de La Habana, 2000.

-
- 301 Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230S-242S, 2005.
- 302 Muller-Decker K, Scholz K, Marks E, Fustenberger G. Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol Carcinogen* 12:31-41, 1995.
- 303 Herencia F, Ferrándiz ML, Ubeda A, Guillén I, Domínguez JN, Charris JE, Lobo GM, Alcaraz MJ. Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 453:129-134, 1999.
- 304 Hamilton LC, Warner TD. Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase *in vivo*: investigations using the selective inhibitors, 1400W and celecoxib. *Br J Pharmacol* 125:335-340, 1998.
- 305 Banerjee T, van der vliet A, Ziboh VA. Down regulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids* 66:485-492, 2002.
- 306 Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A1. *Life Sci* 68:921-931, 2001.
- 307 Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 82:537-548, 2001.
- 308 Chen YC, Yang LL, Lee TJ-F. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 59:1445-1457, 2000.
- 309 Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20:1945-1952, 1999.
- 310 Banerjee T, Valacchi G, Ziboh VA, van D V. Inhibition of TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF- κ B activation in A549 cells. *Mol Cell Biochem* 238:105-110, 2002.
- 311 Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med* 69:973-983, 2003.

-
- 312 Ghezzi P, Garattini S, Mennini T, Bertini R, Delgado Hernandez R, Benigni F. Mechanism of inhibition of tumor necrosis factor production by chlorpromazine and its derivatives in mice. *Eur J Pharmacol* 317:369-376, 1996.
- 313 Clark MA, Plank LD, Connolly AB, Streat SJ, Hill AA, Gupta R, Monk DN, Shenkin A, Hill GL. Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor alpha on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis. A randomized clinical trial. *Crit Care Med* 26:1650-1659, 1998.
- 314 Kavanaugh AF. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 24:593-614, 1998.
- 315 Avontuur JA, Stam TC, Jogen-Laurencic M, Van-Amsterdam JG, Eggermont AM. Effect of L-Name, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF α and nitrite/nitrate in human shock. *Intensive Care Med* 24:673-679, 1998.
- 316 Malek NP, Pluempfe J, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Molecular mechanisms of TNF receptor-mediated signaling. *Recent Results Cancer Res* 147:97-106, 1998.
- 317 Azab A, Fraifeld V and Kaplanski J. Nimesulide prevents lipopolysaccharide induced elevation in plasma tumor necrosis factor- α in rats. *Life Sciences* 63:323-327, 1998.
- 318 Kozak W, Soszynski D, Rudolph K, Leon LR, Conn CA and Kluger MJ. Soluble tumor necrosis factor a receptor prevents decrease of body temperature in mice treated with indomethacin and lipopolysaccharide. *Ann NY Acad Sci* 813:264-271, 1997.
- 319 Picot S, Sheick I, Sylvi A, Donadille A and Ambroise-Thomas P. Signal transduction pathways involved in tumor necrosis factor secretion by plasmodium falciparum-stimulated human monocytes. *Immunology* 83:70-74, 1994.
- 320 Chou Tz-C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 139:1146-1152, 2003.
- 321 van Puijenbroek AAFL, Wissink S, van der Saag PT, Peppelenbosch MP. Phospholipase A2 inhibitor and leukotriene synthesis inhibitors block TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 11:104-110, 1999.
- 322 Tomohiro Nishikori, Kaoru Irie, Taiyo Suganuma, Makoto Ozaki, Toshimasa Yoshioka. Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 451: 327- 333, 2002.
- 323 Gadina M, Bertini R, Mengozzi M, Zandalasini M, Mantovani A, Ghezzi P. Protective effect of Chlorpromazine on endotoxin toxicity and TNF production in glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant models of endotoxic shock. *J Exp Med* 173:1305-1310, 1991.
- 324 Rees DD, Monkhouse JE, Cambridge D, Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br J Pharmacol* 124:540-546, 1998.

-
- 325 Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11:273-277, 1998.
- 326 Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326, 1985.
- 327 Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK. Human microglial cells defense against *Toxoplasma gondii*: the role of cytokines. *J Immunol* 152:1246-1252, 1994.
- 328 Woodroffe MN, Cuzner ML. Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine* 5:583-588, 1993.
- 329 Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon gamma. *Nature* 374:647-650, 1995.
- 330 Yeung MC, Pulliam L, Lau AS. The HIV envelope protein gp120 is toxic to human brain-cell cultures through the induction of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *AIDS* 9:137-143, 1995.
- 331 Snyder SH. Nitric oxide and neurons. *Curr Op Neurobiol* 2:323-327, 1992.
- 332 Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1357-1366, 1999.
- 333 McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain- implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 21:195-218, 1995.
- 334 Takamura T, Kato I, Kimura N, Nakazawa T, Yonekura H, Takasawa S, Okamoto H. Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic β cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J Biol Chem* 273:2493-2496, 1998.
- 335 Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos ARS. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70:93-103, 2004.
- 336 Bauer PH, Belleville-Nabet F, Vauthier E, Colin C, Guédenet JC, Bodenreider O, Dousset B, Nabet P, Mallié P, Larcen A. Metabolism of selenium in a model of mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Therapeutic uses of trace elements*. (edited by Néve et al). Plenum Press, New York. pps. 229-232, 1996.
- 337 Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet*. 338:732-736, 1991.
- 338 Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 216:117-134, 1992.

-
- 339 Szabó C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz* 3:2-32, 1995.
- 340 Novelli GP. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol* 4:517-527, 1997.
- 341 Flowers E, Zimmermann JJ. Reactive oxygen species in the cellular pathophysiology of shock. *New Horiz* 6:169-180, 1998.
- 342 Wendel A, Niehorster M, Tiegs G. In: *Oxidative stress - Oxidants and antioxidants*, H Sies (ed.), Academic Press, London, pp. 585-593, 1991.
- 343 Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 128:2334-2340, 1998.
- 344 Kuprash DV, Udalova IA, Turestkaya RL, Kwiatkowski D, Rice NR, Nedospasov SA. Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 162:4045-4052, 1999.
- 345 Udalova IA, Knight JC, Vidal V, Nedospasov SA, Kwiatkowski D. Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. *J Biol Chem* 273:21178-21186, 1998.
- 346 Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-Acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 140:390-399, 1992.
- 347 Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FG, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 80 (Suppl. 1):S77-S112, 1998.
- 348 Tolando R, Jovanovic A, Brigelius-Flohé R, Ursini F, Maiorino M. Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. *Free Radical Biology & Medicine* 28:979-986, 2000.
- 349 Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53:135-159, 2001.
- 350 Habtemariam S. Natural inhibitors of tumor necrosis factor-alpha production, secretion and function. *Planta Medica* 66:303-313, 2000.
- 351 Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology* 180:45-63, 2002.
- 352 Torgerson TR, Colosia AD, Donahue JP, Lin YZ, Hawiger J. Regulation of NF-κB, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-κB p50. *J Immunol* 161:6084-6092, 1998.

-
- 353 Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 β -induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappa B activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappa B. *Arthritis Rheum* 46:2079-2086, 2002.
- 354 Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *J Leukoc Biol* 71:73-79, 2002.
- 355 Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. *J Nat Prod* 65:505-508, 2002.
- 356 Maggi-Capeyron MF, Ceballos P, Cristol JP, Delbosc S, Le Doucen C, Pons M, Leger CL, Descomps B. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. *J Agric Food Chem* 49:5646-5652, 2001.
- 357 Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, Lal J, Gupta PK. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology* 176:165-173, 2002.
- 358 Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity modulate immune functions in humans *in vitro*. *Cell Immunol* 177:129-136, 1997.
- 359 González FJ, Leyva L, Posadas S, Luque I, Blanca M, Santamaría L, Juárez C. Participation of T lymphocytes in cutaneous allergic reactions to drugs. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 4:3-6, 1998.
- 360 Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol* 47:661-673, 2001.
- 361 Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85:9-18, 2000.
- 362 Boyton RJ, Openshaw PJ. Pulmonary defenses to acute respiratory infection. *Br Med Bull* 61:1-12, 2002.
- 363 Chen X, Krakauer T, Oppenheim JJ, Howard OM. Yin zi huang, an injectable multicomponent chinese herbal medicine, is a potent inhibitor of T-cell activation. *J Altern Complement Med* 10:519-26, 2004.
- 364 Hisano M, Yamaguchi K, Inoue Y, Ikeda Y, Iijima M, Adachi M, Shimamura T. Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Arch Dermatol Res* 295:183-189, 2003.
- 365 Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Cell Biol* 10:405-455, 1994.
- 366 Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptative immunity. *Trends Immunol* 25:280-288, 2004.

-
- 367 Kundakovic T, Stanojkovic T, Juranic Z, Kovacevic N. Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*. *Pharmazie* 60:319-320, 2005.
- 368 Takara K, Horibe S, Obata Y, Yoshikawa E, Ohnishi N, Yokoyama T. Effects of 19 herbal extracts on the sensitivity to paclitaxel or 5-fluorouracil in HeLa cells. *Biol Pharm Bull* 28:138-142, 2005.
- 369 Heinrich M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr Top Med Chem* 3:141-154, 2003.
- 370 Pozarowski P, Halicka DH, Darzynkiewicz Z. Cell cycle effects and caspase-dependent and independent death of HL-60 and Jurkat cells treated with the inhibitor of NF-kappaB parthenolide. *Cell Cycle* 2:377-383, 2003.
- 371 Li-Weber M, Giaisi M, Baumann S, Treiber MK, Krammer PH. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses CD95-mediated activation-induced-cell-death in T-cells. *Cell Death Differ* 9:1256-1265, 2002.
- 372 Kwok BH, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase. *Chem Biol* 8:759-66, 2001.
- 373 Yew Tang S, Whiteman M, Jenner A, Feng Peng Z, Halliwell B. Mechanism of cell death induced by an antioxidant extract of *Cratoxylum cochinchinense* (YCT) in Jurkat T cells: The role of reactive oxygen species and calcium. *Free Radic Biol Med* 36:1588-1611, 2004.
- 374 Sarkar A, Sreenivasan Y, Ramesh GT, Manna SK. β -D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor κ B but potentiates apoptosis. *J Biol Chem* 279: 33768–33781, 2004.
- 375 Li N, and Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?. *FASEB J* 13:1137–1143, 1999.
- 376 Ebert-Duming R, Seufert J, Scheneider D, Kohrle J, Schutze N. Expression of selenoproteins in monocytes and macrophages-implication for the immune system. *Med Klin* 94:329-334, 1999.
- 377 Holben DH and Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 99:836-843, 1999.
- 378 Kim IY and Stadtman TC. Inhibition of NF-kappa B DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12904-12907, 1997.
- 379 Harper R, Wu K, Chang MM, Yoneda K, Pan R, Reddy SP and Wu R. Activation of nuclear factor-kappa B transcriptional activity in airway epithelial cells by thioredoxin but not by N-

acetyl-cysteine and glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:178-185, 2001.

- 380 Tanaka T, Nakamura H, Nishiyama A, Hosoi F, Masutani H, Wada H and Yodoi J. Redox regulation by thioredoxin superfamily : protection against oxidative stress and aging. *Free Radical Res* 33:851-855, 2001.
- 381 Darlington LG, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 85:251-269, 2001.
- 382 Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA and Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2642-2647, 1997.

ANEXOS

PUBLICACIONES QUE CONTIENEN LOS RESULTADOS QUE SE PRESENTAN EN LA TESIS

1. Delgado R, **Garrido G**, González D, Herrera B, Beltrán A, Lemus Y, Rodríguez J, Quintero G, Lodeiro L, Tamayo D, Sironi M, Ledon N, Romay C, García D, Núñez AJ. *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]) as a natural antioxidant with antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Minerva Medica* 92 (Suppl. 1 al N.3):98-102, 2001.
2. Delgado R, **Garrido G**, García D, Beltrán A, Herrera MB, Lemus Y, Rodríguez J, Núñez AJ. Evidencias farmacológicas pre-clínicas de la actividad analgésica, anti-inflamatoria e inmunomoduladora del extracto natural obtenido de la corteza de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). *Revista Cubana de Farmacia* 36 (Suplem. 2):39-41, 2002.
3. G. Martínez Sánchez, R. Delgado Hernández, **G. Garrido Garrido**, M. Guevara García, D. García Rivera, E. Páez Betancourt, A.J. Nuñez Sellés. VIMANG[®]. Nuevo producto natural antioxidante. Mitos y realidades de la terapia antioxidante. Centro de Química Farmacéutica-MINSAP. Combinado Poligráfico “Alejo Carpentier”, La Habana Cuba, ISBN: 959-252-006-2. 50 páginas, 2003.
4. **Garrido G**, González D, Lemus Y, García D., Lodeiro L, Quintero G., Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). *Pharmacological Research* 50(2):143-149, 2004.
5. **Garrido G**, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. Protection against shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide on macrophages and microglia by VIMANG[®], a standard aqueous extract of

Mangifera indica L. Role of mangiferin isolated from the extract. Pharmacological Research 50(2):165-172, 2004.

6. **Garrido G**, Blanco-Molina M, Sancho R, Macho A, Delgado R and Muñoz E. The standard aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* (VIMANG[®]) inhibits T cell proliferation and TNF-induced activation of nuclear transcription factor NF-κB. Phytotherapy Research 19:211-215, 2005.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS

1. Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, **Garrido G**, Castellano M, Mantovani A, Introna M. Characterization on the promoter for the human long pentraxin PTX3: role of NF- κ B in TNF α and IL-1 β regulation. *Journal of Biological Chemistry* 272:8172-8178, 1997.
2. **Garrido G**, Martín E, Latini R, Introna M. PTX3 mRNA in the cardiac tissue of the rat. *Advances in Modern Biotechnology* 4:N22, 1997.
3. Beltrán AE, Concepción F, Manzanares D, **Garrido G**, Glaría LA, Rojas A. Heparin and low molecular weight heparin (LMWH) decreases nitric oxide production by human polymorphonuclear cells. *Archives of Medical Research* 30:116-119, 1999.
4. Masson S, Masseroli M, Fiordaliso F, Calvillo L, D'Aquila S, Bernasconi R, **Garrido G**, Torri M, Razzetti R, Bongrani S and Latini R. Effects of DA₂/alpha₂ agonist and a beta₁-blocker in combination with an ACE inhibitor on adrenergic activity and left ventricular remodelling in an experimental model of left ventricular dysfunction after coronary artery occlusion. *Journal Cardiovascular Pharmacology* 34:321-326, 1999.
5. Martínez G, Delgado R, Pérez G, **Garrido G**, Núñez Sellés AJ and León OS. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). *Phytotherapy Research* 14:424-427, 2000.
6. **Garrido G**, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez AJ and Morales MA. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). *Phytotherapy Research* 15:18-21, 2001.
7. Cancino Badias L, Leyva González A, **Garrido Garrido G**, Cossio Ayala M, Prieto González E. Vimang: Los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas

- glutación peroxidasa y glutación S-transferasa. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 20: 48-53, 2001.
8. Tamayo D, Mari E, González S, Guevara M, **Garrido G**, Delgado R, Marchioli R, Núñez AJ. Vimang[®] as natural antioxidant supplementation in patients with malignant tumours. Minerva Medica 92 (Suppl. 1 al N.3):95-97, 2001.
 9. Molina J, García A, Ríos P, Ramírez E, **Garrido G**, Delgado R, Hernández I and Prieto S. Biological activities of alkamides from species of the tribe Anthemidea (*Asteraceae*) endemic to Mexico. Revista de Fitoterapia 2 (Suppl. 1): 316-317, 2002.
 10. Diéguez R, **Garrido G**, Márquez L, Hernández I, Martínez I, González L, Iznaga Y, Agüero J, Rivas Y, Prieto S, Molina J, Delgado R. Actividades biológicas de posible utilidad veterinaria en extractos de especies vegetales del género *Zanthoxylum* (*Rutaceae*). CD-Memorias del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; ISBN 959-7164-32-9; pps. 104-110, 2002.
 11. Prieto S, **Garrido G**, González JA, Molina J. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. Revista CNIC (Ciencias Biológicas) 33(3): 99-116, 2003.
 12. Beltrán AE, Ledón N, Romay C, Sironi M, Quintero G, **Garrido G**, Delgado R. VIMANG[®] y mangiferina inhiben la expresión de ICAM-1 en células endoteliales estimuladas con citocinas proinflamatorias. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 22(3):164-172, 2003.
 13. Diéguez-Hurtado R, **Garrido-Garrido G**, Prieto-González S, Iznaga Y, González L, Molina-Torres J, Curini M, Epifano F, Marcotullio MC. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. Fitoterapia 74:382-386, 2003.
 14. **Garrido G**, Delgado R, Lemus Y, García Dr, Beltrán A, Rodríguez J, Quintero G, Delporte C, Backhouse N, Morales MA, Payá M, Muñoz E, Guevara M, Alvarez A,

- Boza A, Arús L, Cabrera P, Núñez-Sellés AJ. Extracto natural de *Mangifera indica* L. (VIMANG®): de la etnomedicina a la clínica. BLACPMA 3(6):107-109, 2004.
15. Guevara M, Alvarez A, Riaño A, **Garrido G**, Paez E. Uso etnomédico de un extracto de *Mangifera indica* en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales 9(1), 2004.
 16. Diéguez R, Rivas Y, Prieto-González S, **Garrido G** y Molina-Torres J. Potencialidad del género *Zanthoxylum* como fuente de agentes con actividad biológica. Acta Farmacéutica Bonaerense 23(1):243-251, 2004.
 17. Pino S, González JL, González JA, Agüero J, **Garrido G**, García M, Carballo MT, Echemendía OA, Urquiola A, Rastrelli L, Molina J, Prieto S. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of *Erythrina fusca*, Lour. Acta Farmaceutica Bonaerense 23(4): 453-458, 2004.
 18. **Garrido G**, González D, Lemus Y, Lodeiro L, Quintero G, Delporte C, Núñez-Sellés AJ, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG®) against mouse ear edemas and its inhibition on eicosanoids production in J774 murine macrophages. Phytomedicine (en prensa).

**PRINCIPALES EVENTOS EN LOS QUE SE HAN PRESENTADO TRABAJOS
RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS**

1. Efectos analgésico y anti-inflamatorio del extracto de *Mangifera indica* L. (QF-808). C. Delporte, N. Backhouse, **G. Garrido**, A.J. Núñez, M.A. Morales. I Congreso Internacional Farmacología'98, Cuba, 19-23 octubre 1998.
2. *Mangifera indica* L. extract (VIMANG) inhibits TNF production during endotoxic shock in mice and reduce nuclear factor κ B activation. R. Delgado, D. González, **G. Garrido**, B. Herrera, G. Quintero, O. Blanco, A. Rojas, A. Catania, A.J. Núñez. III Simposio Internacional Estrés Oxidativo en Biomedicina, Cuba, 24-26 noviembre 1999.
3. Inhibitory effect of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]) on tumor necrosis factor production during endotoxic shock and reduction of nuclear factor- κ B activation. R. Delgado, D. González, **G. Garrido**, B. Herrera, G. Quintero, A. Rojas, A. J. Núñez, L. Re. VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics IUPHAR & 4th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Italia, 16-20 julio 2000.
4. Analgesic and anti-Inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). **G. Garrido**, D. González, C. Delporte, N. Backhouse, G. Quintero, A. J. Núñez, M. A. Morales, and R. Delgado. VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics IUPHAR & 4th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Italia, 16-20 julio 2000.
5. New antioxidant product derived from *Mangifera indica* L. R. Capote-Hernández, J. Agüero-Agüero, **G. Garrido**, R. Delgado, G. Martínez, O. León, M.A. Morales,

- A.J. Núñez-Sellés. 220 Fall Meeting, American Chemical Society, Estados Unidos, agosto 2000.
6. VIMANG[®]: The natural extract of *Mangifera indica* L. with analgesic and anti-inflammatory activities. **G. Garrido**, D. González, R. Delgado, C. Delporte, N. Backhouse, G. Quintero, L. Lodeiro, M. Morales, A.J. Núñez-Sellés. XVI Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Farmacología y II Iberoamericano, Brasil, 13-17 septiembre 2000.
 7. Immunopharmacological mechanisms involved in the anti-inflammatory action of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). R. Delgado, D. González, **G. Garrido**, G. Quintero, Y. Lemus, A.J. Núñez. XVI Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Farmacología y II Iberoamericano, Brasil, 13-17 septiembre 2000.
 8. VIMANG[®]: Un producto natural con acción analgésica y anti-inflamatoria. **G. Garrido**, R. Delgado, D. González, C. Delporte, N. Backhouse, Y. Lemus, G. Quintero, L. Lodeiro, S. Prieto, MA Morales, AJ Núñez-Sellés. IX Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina “Julio Samper”, Italia, septiembre 2000.
 9. *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. R. Delgado, Y. Lemus, D. González, **G. Garrido**, G. Quintero, L. Lodeiro, B. Herrera, A.J. Núñez. I Seminario Científico, Centro de Química Farmacéutica. IV Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Química, Cuba, 16-20 abril 2001.
 10. Inhibición de mediadores de la inflamación por un extracto de *Mangifera indica* y su xantona glicosilada mangiferina. **G. Garrido**, R. Delgado, D. González, C. Delporte, N. Backhouse, Y. Lemus, G. Quintero, L. Lodeiro, S. Prieto, MA Morales, AJ Núñez-Sellés. III Taller Internacional “Química de los Productos

Naturales". IV Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Química, Cuba, 16-20 abril 2001.

11. *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]) as a natural antioxidant with antinociceptive and anti-inflammatory properties. R. Delgado, **G. Garrido**, D. González, B. Herrera, A. Beltrán, Y. Lemus, J. Rodríguez, G. Quintero, L. Lodeiro, D. Tamayo, M. Sironi, N. Ledon, C. Romay, D. García, A.J. Núñez. International Congress of Herbal Medicine and Cancer, Italia, 8-9 junio 2001.
12. VIMANG[®] inhibe mediadores de la inflamación tanto *in vivo* como *in vitro*. **G. Garrido**, R. Delgado, D. González, Y. Lemus, G. Quintero, L. Lodeiro, A.J. Núñez-Sellés. IV Simposio de Estrés Oxidativo, Cuba, 16-18 julio 2001.
13. VIMANG[®], un antioxidante con actividad anti-inflamatoria y analgésica. **G. Garrido**. Curso Taller Iberoamericano Nuevas Dianas en Malaria, Inflamación y Cáncer, Bolivia, 26 julio 2001.
14. Extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* L. Mecanismos involucrados en su actividad anti-inflamatoria. R. Delgado, **G. Garrido**, D. García, A. Beltrán, D. González, B. Herrera, J. Rodríguez, Y. Lemus, L. Lodeiro, G. Quintero, S. Prieto, C. Delporte, N. Backhouse, M. Payá, M.J. Alcaraz, A.J. Núñez-Sellés. I Congreso Iberoamericano de Química Fina Farmacéutica. CYTED-X, España, 15-19 abril 2002.
15. VIMANG[®]: Extracto Natural antioxidante, analgésico y antiinflamatorio. **G. Garrido**, M. Guevara, L. Gil. VIII Seminario Internacional de Atención Primaria de la Salud, Cuba, 17-21 junio 2002.
16. Evidencias farmacológicas pre-clínicas de la actividad analgésica, anti-inflamatoria e inmunomoduladora del extracto natural obtenido de la corteza de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). R. Delgado, **G. Garrido**, D. García, A. Beltrán, M. B.

- Herrera, Y. Lemus, J. Rodríguez, A.J. Núñez. IV Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica, Cuba, 15-18 octubre 2002.
17. Nuevos aportes al conocimiento de los mecanismos moleculares de acción anti-inflamatoria del extracto natural de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). **Gabino Garrido**, Yeny Lemus, Dagmar García, Janet Rodríguez, Amada Beltrán, Ioanna Martínez, Lucía Márquez. René Delgado. V Simposio de Estrés Oxidativo en Biomedicina. Cuba, 14-16 octubre 2003.
18. Standard stem bark extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]) inhibits T cell proliferation and TNF-induced activation of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B). **Gabino Garrido**, Magdalena Blanco-Molina, Rocío Sancho, Antonio Macho, René Delgado, Eduardo Muñoz. Biotecnología Habana 2003, Cuba, noviembre 2003.
19. Principales evidencias farmacológicas e impacto terapéutico de una línea de productos naturales cubanos derivados de la corteza de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). **G. Garrido**. XXI Conferencia Científica del CIMEQ. Cuba, 24 marzo 2004.
20. Evaluación pre-clínica del extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). Dilucidación de su mecanismo de acción anti-inflamatoria. **G. Garrido**, R. Delgado, Y. Lemus, D. García, G. Quintero, L. Lodeiro, I. Martínez, A. Beltrán, C. Delporte, E. Muñoz, M. Payá, C. Romay, N. Ledón, A.J. Núñez. I Taller Internacional “Química y Aplicaciones del Vimang”. Cuba, 1 abril 2004.

OTROS RECONOCIMIENTOS

Logro Científico Introducido en la Práctica Social:

- Nueva línea de productos naturales a partir del extracto de *Mangifera indica* L. con actividad antioxidante. A.J. Nuñez, E. Paez, R. Capote, J. Agüero, **G. Garrido**, G. Martínez, O.S. León, R. Delgado, M. Guevara, S. Valdés, X. Alvarez, D. Amaro, J. Acosta, A. Boza, O. García, I. Morales, M. R. Gárciga. Año 1999

Logros Científicos Aplicados a la Salud:

- Crema Vimang®: coadyuvante de la terapia establecida de las enfermedades que tengan un componente doloroso y(o) inflamatorio. **Gabino Garrido Garrido**, Daniel Amaro González, Jhoany Acosta Esquijarosa, Anailián Boza Rivero, Laura Arús Pampín, Oscar García Pulpeiro, Armando Paneque Quevedo, Lisette Sordo Martínez, Francisco Concepción, Eddy Castellanos, René Delgado Hernández, Mariela Guevara García, Pablo Cabrera Lima, Eleuterio Páez Betancourt, Alberto J. Núñez Sellés. Año 2004.
- Tableta Vimang®: coadyuvante de la terapia establecida de las enfermedades que tengan un componente doloroso y(o) inflamatorio. **Gabino Garrido Garrido**, Daniel Amaro González, Jhoany Acosta Esquijarosa, Anailián Boza Rivero, René Delgado Hernández, Armando Paneque Quevedo, Lisette Sordo Martínez, Francisco Concepción, Eddy Castellanos, Mariela Guevara García, María R. Gárciga Hernández, Iván G. Morales Lacárrere, Dagmar García Rivera, Pablo Cabrera Lima, Ulises Jáuregui Haza, Eleuterio Páez Betancourt, Alberto J. Núñez Sellés. Año 2004.

Registro Sanitario, como Medicamento de Origen Natural, No. N-03-148-M02 (Crema) y No. N-04-113-HM0-C (Tableta). CECMED, noviembre 2003 y agosto 2004, respectivamente.

Introducción de las formas farmacéuticas Vimang® crema y tabletas en el Cuadro Básico de Medicamentos de la República de Cuba. Diciembre 2004.

Resultados Relevantes del Centro de Química Farmacéutica:

- QF-808: Investigación-desarrollo de un nuevo producto natural ecológicamente sostenible para la mejoría de la calidad de vida. A.J. Núñez, E. Páez, R. Capote, H. Novoa, J. Agüero, J. Lora, I. Guardado, L. Caveda, **G. Garrido**, L. Cancino, S. Valdés, X. Alvarez, B. Herrera, D. González, D. Amaro, A. Gago, J. Acosta, N. Hernández. Año 1997.
- Efecto anti-inflamatorio y analgésico del extracto natural de *Mangifera indica* L. (VIMANG®). Contribución al estudio de su mecanismo de acción. **G. Garrido**, D. González, R. Delgado, G. Quintero, B. Herrera, A. Rojas, C. Delporte, N. Backhouse, A.J. Núñez-Sellés, M.A. Morales. Año 1999.
- Efecto anti-inflamatorio del extracto de *Mangifera indica* L. (VIMANG®) y el esclarecimiento de su mecanismo de acción. **Gabino Garrido Garrido**, René Delgado Hernández, Gypsy Quintero Rodríguez, Yeny Lemus Molina, Janet Rodríguez Morales, Mariela Guevara García, Dagmar García Rivera, Alina Alvarez León, Alberto J. Núñez Sellés. Año 2004.

Premio OCPI - ExpoCuba 2000 en la Modalidad Invención por Línea de Productos Naturales con Propiedades Antioxidantes. OCPI, Cuba, 11 de septiembre de 2000.

Premio Destacado en el XIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica: VIMANG[®]. Nueva Línea de Productos Naturales, Cuba, 7 de enero de 2001.

Premio Nacional de Farmacología, 2004: Protección contra el choque séptico y supresión de la producción del factor de necrosis tumoral alfa y el óxido nítrico sobre macrófagos y microglías por un extracto acuoso estándar de *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). Rol de la mangiferina aislada del extracto. **Garrido G**, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. Cuba, 25 de octubre de 2004.

Artículo Científico de Mayor Originalidad en el Centro de Química Farmacéutica, 2004: Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG[®]). Role of mangiferin isolated from the extract. **Garrido G**, Delgado R, Lemus Y, Rodríguez J, García D, Núñez-Sellés AJ. *Pharmacological Research* 50(2):165-172, 2004. Noviembre de 2004.

Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba, 2004: VIMANG[®]: Nuevo producto natural con propiedades antioxidante, anti-inflamatoria y analgésica. Alberto J. Nuñez Sellés, Eleuterio Páez Betancourt, Gregorio Martínez Sánchez, **Gabino Garrido Garrido**, René Delgado Hernández. Cuba, 15 de enero de 2005.

Premio Nacional Anual de Salud, 2005: VIMANG[®]: Nuevo producto natural con propiedades antioxidante, anti-inflamatoria y analgésica. **Gabino Garrido Garrido**,

René Delgado Hernández, Gypsy Quintero Rodríguez, Yeny Lemus Molina, Janet Rodríguez Morales, Dagmar García Rivera, Gregorio Martínez Sánchez, Mariela Guevara García, Alina Álvarez León, Daniel Amaro González, Jhoany Acosta Esquijarosa, Anailián Boza Rivero, Laura Arús Pampín, Armando Paneque Quevedo, Lissette Sordo Martínez, Francisco Concepción, Eddy Castellanos, María R. Gárciga Hernández, Iván G. Morales Lacárrere, Oscar García Pulpeiro, Pablo Cabrera Lima, Ulises Jáuregui Haza, Eleuterio Páez Betancourt, Alberto J. Núñez Sellés. Cuba, 18 de junio de 2004.

PATENTE OTORGADA

Composiciones Farmacéuticas y suplementos nutricionales a partir de extractos de *Mangifera indica* L. Centro de Química Farmacéutica (Alberto Julio Nuñez Sellés, Eleuterio Paez Betancourt, Daniel Amaro González, Jhoany Acosta Esquijarosa, Juan Agüero Agüero, Raúl Capote Hernández, María Rosa Gárciga Hernández, Iván G. Morales Lacárrere, Oscar García Pulpeiro, **Gabino Garrido Garrido**, Gregorio Martínez Sánchez, Miguel Angel Morales Segura). Certificado No. 22 846, Tomo: 001 Folio: 077, Año: 2002. No. de Solicitud: 203/98

ABREVIATURAS UTILIZADAS

5-ASA:	Acido 5-aminosalicílico
5HT:	5-hidroxitriptamina o serotonina
AA:	Acido araquidónico
ADN:	Acido desoxirribonucleico
AINE:	Anti-inflamatorio no esteroideo
AMPc:	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA:	Análisis de varianza
ARN:	Acido ribonucleico
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50
COX:	Ciclooxigenasa
CQF:	Centro de Química Farmacéutica
DE ₅₀ :	Dosis efectiva 50
DMEM:	Dulbecco's modified eagle medium (medio de cultivo celular)
DMSO:	Dimetil sulfóxido
Dox:	Doxiciclina
DSTF:	Disolución salina tamponada con fosfato
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Acido etilendiaminotetracético
e.e.m.:	Error estándar de la media
EIA:	Inmunoensayos enzimáticos
EMSA:	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
EROs:	Especies reactivas del oxígeno
EU:	Estados Unidos

FAP:	Factor activador plaquetario
FCS:	Suero fetal de ternera
FLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂
fMLP:	Péptido metionil n-formilado (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina)
FNT α :	Factor de necrosis tumoral alfa
GDP:	Guanosina difosfato
GMPc:	Guanosina monofosfato cíclico
G3PDH:	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GPx:	Glutación peroxidasa
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
GTP:	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
[³ H]dThd:	Deoxitimidina marcada
HEPES:	Acido 4-(2-hidroximetil)-1-piperazin-etanosulfónico
HOCl:	Acido hipocloroso
HPETE:	Acido hidroperoxieicosatetraenoico
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN γ :	Interferón gamma
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
IL-1R:	Receptor de IL-1
i.p:	Intraperitoneal
I-R:	Isquemia-reperfusión
L-NMMA:	N-monometil-L-arginina

LOX:	Lipoxigenasa
LPMN:	Leucocitos polimorfonucleares
LPS:	Lipopolisacárido o endotoxina de la pared bacteriana
LT:	Leucotrieno
MMPs:	Metaloproteinasas de la matriz
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
NADPH:	Fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina
NDGA:	Acido nordihidroguaiarético
NF-κB:	Factor de transcripción nuclear κB
NP-40:	Nonidet (agente no iónico, detergente)
ON:	Oxido nítrico
ONS:	Oxido nítrico sintasa
³² P:	Fósforo 32 radioactivo
PBMC:	Células mononucleares periferales humanas
PMA:	Acetato de forbol miritilo
PMSF:	Sulfonilfluoruro de fenilmetano
p.o:	Vía oral
PG:	Prostaglandina
RU:	Reino Unido
Se:	Selenio
SEB:	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SNC:	Sistema nervioso central
TBS:	Disolución tamponada con Tris
TCR:	Receptor de células T
TPA:	Tetradecanoil forbol acetato

TX: Tromboxano

VCAM: Molécula de adhesión vascular