

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE
CLUSIA ELLIPTICIFOLIA EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y
QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON
LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)**

DANNY ALEXANDER GARZÓN CAICEDO

JORGE ROBLES CAMARGO

Director

Presentado como requisito parcial

para optar por el título de

BIÓLOGO

Bogotá D.C., Colombia

Diciembre de 2015

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE
CLUSIA ELLIPTICIFOLIA EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y
QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON
LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)**

APROBADO

Concepción Judith Puerta Bula PhD.

Decana Académica

Andrea Patricia Forero Ruiz

Directora de Carrera de Biología

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE EXTRACTOS DE *CLUSIA ELLIPTICIFOLIA* PARA REGULAR LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Danny Alexander Garzón Caicedo

ABROBADO

Jorge Robles Camargo M.Sc., PhD

Directo de Trabajo de Grado

Jhon Jairo Sutachan M.Sc., PhD

Co-director de trabajo de grado

Alfonso Barreto Prieto M.Sc., PhD

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por las puertas que me abrió para la realización de este trabajo y por la fuerza constante que me brindo para finalizarlo, también agradezco mucho a la gran cantidad de profesores como Jorge Robles y Jhon Sutachan que me dieron su confianza tanto en el área de química como en neuro-bioquímica, sin ellos no hubiera podido continuar con este proceso. De igual manera agradezco a las profesoras María Lucía Gutiérrez y a Luz Stella, quienes me asesoraron y me brindaron su ayuda durante todo el proyecto, finalmente a todos mis compañeros del laboratorio que me brindaron mucho conocimiento y apoyo en cada experimento o duda que yo tenía, finalmente a mi familia por estar siempre pendiente de mí en todo este recorrido por la universidad

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
MARCO TEORICO	12
Papel de los astrocitos en el proceso inflamatorio	12
Activación glial.....	13
COX2 e iNOS	14
Factor Nuclear Kappa Beta (NF- κ B) p50/p65	15
Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α)	15
Interleuquina-6 (IL-6)	16
Interleuquina-10 (IL-10).....	16
Interleuquina – 12 (IL-12)	16
Interferon gamma (IFN).....	16
Descripción botánica y farmacológica de la especie	17
Etnobotánica	17
Fitoquímica	17
Actividades biológicas	18
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	19
METODOLOGIA.....	19
Pruebas químicas	19
Pruebas cromatográficas	20
Pruebas biológicas	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1. Pruebas químicas preliminares	24
Cromatografía en capa fina.....	27
2.Determinacion de pureza de los cultivos usados por medio de anticuarpó para GFAP	31
2.1Curva dosis respuesta del extracto polar y apolar.....	31

3. Determinación del perfil de citoquinas de astrocitos activados con LPS	37
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

RESUMEN

Durante hemorragias e isquemias, el Sistema Nervioso Central (SNC) responde sistémicamente a las lesiones desarrollando un proceso inflamatorio, que es producto de la activación glial que si perdura conlleva a la degeneración neuronal (Xia, W. *et al*, 2010 y 2013). Esta activación (microglia y astrocitos) está asociada a cambios morfológicos de estas células, las cuales empiezan un proceso de proliferación y de producción de mediadores pro- y anti-inflamatorio como TNF- α , NO y ROS (mediadores pro-inflamatorios) los cuales se ha demostrado son responsable de iniciar y mantener mecanismos neurodegenerativos (Heneka, M. *et al*, 2007. Estos cambios se han evidenciado en patologías como el Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral y dolor neuropático. Por lo anterior, se ha sugerido que la modulación de la respuesta inflamatoria podría reducir la neurodegeneracion típica de estas patologías (Heneka, M. 2010).

Actualmente las pruebas para regular una respuesta anti-inflamatoria usando compuestos no esteroides no han arrojado resultados convincentes, en parte esto es debido a que dosis que son efectivas generan efectos secundarios . Otros estudios proponen que metabolitos secundarios aislados de plantas pueden modular esta respuesta inflamatoria contrarrestando el efecto neurodegenerativo por la sobre activación de los astrocitos (Krifa M, *et al.*, 2013; Tanaka T, Takahashi R. 2013). Por ejemplo, estudios etnobotánicos han mostrado que algunas de las plantas pertenecientes a la familia Clusiaceae tienen actividad anti-inflamatoria sin embargo, no hay registros que evalúen su real potencial anti-inflamatorio en células nerviosas.

En el presente proyecto se propuso evaluar la capacidad de extractos polar y no polar de *Clusia ellipticifolia* para regular la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en cultivo primario de astrocitos activados por LPS. Para esto se obtuvieron

extractos etanolicos (polares) y etereos (apolares) de hojas de *Clusia ellipticifolia*. Una vez obtenidos estos extractos se evaluó la toxicidad y la capacidad de regular la activación y expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de astrocitos activados con lipopolisacarido (LPS)

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron identificar el potencial terapéutico de plantas de la familia Clusiaceae para regular procesos neuro-inflamatorios que puedan ser utilizados en futuros experimentos *in vivo* en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.

Se obtuvieron en las pruebas químicas la presencia de los terpenos, triterpenos esteroidales y esteroides en el extracto apolar y fenoles y flavonoides, terpenos y glucósidos en el extracto polar, se evidencio toxicidad sobre las células en las concentraciones polares de 1 y 0.1 mg/mL y apolares de 0.02 y 0.01 mg/mL finalmente, al inducir con LPS se expresaron IL-6, TNF y CCL2, sin embargo no hubo efecto significativo de los extractos sobre la modulación de estas citoquinas y quimioquinas.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) está conformado por una enorme cantidad de células gliales como la microglia, oligodendrocitos y los astrocitos, las cuales superan cinco veces en cantidad a las células nerviosas. Estas células se caracterizan por ser altamente especializadas contribuyendo con el desarrollo del sistema nervioso y la plasticidad sináptica, también participan en la regulación de los neurotransmisores y ayudan a mantener el equilibrio iónico de las neuronas, entre otras funciones (Maragakis & Rothstein, 2006). En este grupo de células, se destacan los astrocitos los cuales son las células gliales más abundantes interactuando directamente con las neuronas, proporcionándoles soporte estructural y metabólico favoreciendo la homeóstasis en el SNC (Cao, L. et al, 2007; Fei, H. y Yi, E. Sun, 2007; Guillamon & Vivancos, 2015; Maragakis & Rothstein, 2006).

Debido a que los astrocitos juegan un rol importante el mantenimiento de la homeostasis, estos juegan un rol importante en el origen de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Alzheimer (AD), y amiotrófica esclerosis lateral (ALS) (Phatnani & Maniatis, 2015; Weydt P. & Moller T., 2005). Las cuales ocasionan un estado en los astrocitos de alta actividad por lo cual se hipertrofian aumentando la expresión de filamentos intermedios como vimentina, nestina y proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Adicionalmente los astrocitos en este estado liberan mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas 1 β (IL-1 β) y IL-6 que conllevan a la activación del factor de transcripción NF- κ B, así como también a la activación de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que conducen a un proceso neuro-inflamatorio (Buffo, A. et al., 2010; Carrero, et al. 2012; Kaneko, Y. et al 2012).

Actualmente, los principales tratamientos para estas enfermedades está basada en agentes que minimizan el impacto de la enfermedad disminuyendo el tiempo de la neurodegeneración. Sin embargo, en la mayoría de casos el tratamiento carece de efectividad dado que las moléculas usadas presentan dificultad en la permeabilización de la barrera hemato-encefálica (BHE). En la necesidad de buscar alternativas a los actuales tratamientos, se han realizado estudios usando metabolitos secundarios extraídos de plantas los cuales pueden modular la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que los compuestos flavonoides tienen efectos significativos inhibiendo la activación de NF- κ B y la sobreexpresión de TNF- α (Lee C. et al, 2012; Sharma V et al, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar la capacidad de los extractos de *Clusia ellipticifolia* para regular la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en astrocitos activados con LPS. Se realizó a partir de los aislamientos de astrocitos de corteza de los cerebros de ratones neonatos, posteriormente fueron estimulados con LPS a la que posteriormente se trataron con el extracto polar y apolar de la planta *Clusia ellipticifolia* para evaluar su efecto mediante citometría de flujo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan el SNC y se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva en áreas concretas cerebrales o en los sistemas anatomofuncionales (Torrell, 2015). En Colombia, según los datos del estudio epidemiológico nacional, la prevalencia global ajustada por edad de demencia en mayores de 50 años fue de 13.1 personas por cada 1000 habitantes (Takeuchi & Guevara, 1999).

Diferentes patologías neurodegenerativas como el Alzheimer (EA) (Carrero I, et al., 2012; Medeiros R. & La Ferla, 2013), la enfermedad de Parkinson (EP) (Niranjan, R. 2013) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Weydt P. & Moller T., 2005), se caracterizan por presentar un proceso inflamatorio crónico que podría estar relacionado con la distrofia progresiva de las células (Frank-Cannon et al., 2009). En este proceso inflamatorio hay una importante participación de los astrocitos, los cuales son las células gliales más abundantes de SNC y tienen un rol importante al momento de responder a los insultos (Cao, L. et al, 2007).

La contribución de los astrocitos al proceso inflamatorio, se inicia con su activación, en un fenómeno conocido como astrogliosis o reactividad glial (Buffo, A. et al., 2010) la cual ocasiona que se aumente la producción y liberación de factores tróficos, metabolitos claves para la supervivencia neuronal y la degradación de restos celulares y mediadores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas 1 β (IL-1 β) y IL-6 que conllevan a la activación del factor de transcripción NF- κ B así como también a la activación de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que conducen a un proceso neuro-inflamatorio (Buffo, A. et al., 2010; Carrero, I et al. 2012)

Se ha propuesto que cuando la activación glial es crónica o incontrolada, puede causar una disminución de los factores tróficos y acumulación de mediadores pro-inflamatorios potencialmente neurotóxicos que pueden conducir a un proceso de neurodegeneración y muerte neuronal (Kaneko, Y. et al 2012). Por lo anterior, se ha sugerido que la modulación

de la respuesta inflamatoria podría reducir la neurodegeneración típica en estas patologías (Heneka, M. 2010).

Estudios pre-clínicos usando anti-inflamatorios no esteroideos contra COX-1, COX-2 o PPAR- γ han mostrado resultados promisorios sin embargo, estas drogas no han arrojado datos convincentes en triales clínicos. Adicionalmente, la generación de efectos secundarios previene el uso de dosis más altas que son más efectivas. Por esta razón, existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas que tengan el potencial de regular los procesos neuroinflamatorios crónicos. Diferentes estudios han reportaron que metabolitos secundarios extraídos de plantas pueden modular la respuesta inflamatoria (Kriha M, et al., 2013; Tanaka T, Takahashi R. 2013). Por ejemplo, la curcumina, un polifenol, tiene la capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas, mientras que flavonoides como la Wogonina, Luteolina y Quercitina inhiben la activación de NF- $\kappa\beta$ así como también la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la expresión de TNF- α , IL-6 y IL8 en macrófagos (Lee C. et al, 2012; Sharma V et al, 2007).

En la actualidad existen numerosos estudios etnobotánicos en los cuales se registra la propiedad anti-inflamatoria de las plantas pertenecientes a la familia clusiaceae, sin embargo hay una gran escasez de estudios sistemáticos que evalúen el real potencial anti-inflamatorio que este grupo posee. El presente proyecto evaluó la capacidad de extractos polar y apolar de la planta *Clusia ellipticifolia* para regular la producción de citoquinas y quimioquinas pro- inflamatorias por astrocitos activados por LPS. Los resultados obtenidos en este proyecto permitirán identificar el potencial terapéutico de plantas de la familia Clusiaceae para regular procesos neuro-inflamatorios que puedan ser utilizados en futuros experimentos *in vivo* en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.

MARCO TEORICO

Papel de los astrocitos en el proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio en el SNC se da como una respuesta sistémica frente a lesiones, como accidentes hemorrágicos o isquémicos que pueden desembocar en degeneración neuronal progresiva sino es controlado (Xia, W. *et al*, 2013). Ésta respuesta se caracteriza por la activación de células gliales, sin embargo, si esta activación es crónica resulta en efectos deletereos para las neuronas (Xia, W. *et al*, 2010). Los astrocitos son considerados células inmunocompetentes y el puente de comunicación entre el SNC y el sistema inmune. La neuroglia fagocita células y actúa como células antigénicas debido a que los astrocitos expresan receptores Toll, dominios de oligomerización de nucleótidos, quinasas dependientes de RNA, y receptores de manosa. Además producen citoquinas y quimioquinas que actúan como mediadores de la inmunidad junto con la microglía (Owens, T. 2005; Farina, C. *et al*, 2007 citado en Wang, D & Bordey, A. 2008; Fuller, S. *et al*, 2010).

En el SNC, las células microgliales son las encargadas de responder inmunológicamente a señales inflamatorias expresando receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y produciendo señales que alertan sobre el daño celular (Fuller, S. *et al*, 2010). Sin embargo, los astrocitos también expresan PRRs como TLR2, TLR3 y TLR4 (Bsibsi *et al*, 2006; Bowman, C. *et al*, 2003 citado en Fuller, S. *et al*, 2010). De esta manera pueden activar diversas vías de señalización que protegen a las neuronas y reparan el tejido (Bsibsi, M. *et al*, 2006). Los astrocitos también expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y están involucradas en la señalización de células-T a través de quimioquinas y citoquinas (Fuller, S. *et al*, 2010).

Las citoquinas y quimioquinas son proteínas que actúan en el crecimiento, diferenciación y activación de respuestas inmunes (Fuller, S. *et al*, 2010). Los astrocitos pueden producir una amplia variedad de citoquinas: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 y IL-12, IFN- α/β y $-\gamma$ GM-CSF, M-CSF y G-CSF, TGF- β , TNF- α , y quimioquinas tales como RANTES, IL-8, CCL2 Y IP-10, que tienen por función contribuir al desarrollo de la inflamación dentro del SNC, pero

que también están asociadas al progreso de la enfermedad neurodegenerativa cuando la reactividad es crónica (Fuller, S. *et al*, 2010).

Por lo anterior, los astrocitos reactivos pueden perder su función protectora y ser un factor que acelere los procesos neurodegenerativos tal como se evidencia en diferentes patologías como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral, y dolor neuropático (Xia, W. *et al*, 2013). Adicionalmente, los astrocitos activados también pueden aumentar la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), al igual que las células microgliales, lo que puede causar la muerte celular y daños irreversibles a las neuronas (Fuller, S. *et al*, 2010). Así, la activación crónica de éstas células implica la liberación de moléculas neurotóxicas como citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y ROS (Hashioka, S. *et al*, 2009). El óxido nítrico (NO) es una molécula que cumple importantes funciones como la neuro-transmisión y la vasodilatación en el SNC, pero en altas concentraciones puede ser neurotóxica debido a que puede reaccionar produciendo otros radicales libres denominados especies de nitrógeno reactivo (RSN). En la enfermedad de Alzheimer, la nitración de tirosinas está influenciada por RSN y se consideran un factor importante en la neurodegeneración (Fuller *et al*, 2010). Los astrocitos producen prostaglandinas como la PGE₂ que también contribuyen en el proceso inflamatorio, al igual que proteínas del sistema complementario (C2, C3, C5, C6, C7 y C8) que desempeñan un papel importante en la respuesta a daños sistémicos induciendo lisis celular (Fuller, S. *et al*, 2010; Satoh, K. *et al*, 2000; Pekny, M. *et al*, 2007 citado en Fuller, S. *et al*, 2010).

Activación glial

La activación glial es un proceso que puede desencadenarse bien por la disrupción de las señales inhibitorias que las células gliales reciben en condiciones fisiológicas, o bien por la aparición de estímulos activadores, tales como restos celulares, citoquinas pro-inflamatorias, o por la presencia de agregados proteicos anormales (Hanisch, U. *et al*, 2007). Este proceso se caracteriza por el cambio morfológico y la proliferación de los astrocitos y la microglía, así como de la producción de una gran variedad de mediadores pro y anti-inflamatorios. Entre los mediadores pro-inflamatorios se encuentran citoquinas

con IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α y las enzimas NOS-II y COX-2 (Hanisch, U. 2002; Hanisch, U. 2013). Se ha postulado que la presencia crónica de moléculas como TNF- α , NO y ROS, dada por la activación continuada o exacerbada, podría ser responsable de los mecanismos de neurodegeneración (Heneka, M. et al, 2007).

COX2 e iNOS

La activación de las células gliales es atribuida a las señales de transducción que, a su vez, lideran la activación de enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa 2 (COX2), citoquinas tales como interleuquina-1 β y TNF- α (Lau, F. *et al*, 2009). Las formas inducibles de NOS y COX2 son las responsables del incremento de la concentración de óxido nítrico y prostaglandinas en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Depboylu, C. *et al*, 2011).

La COX2 es la encargada de catalizar la transformación del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos, lípidos mediadores involucrados en procesos fisiológicos y patológicos del cerebro. Estas moléculas están implicadas en la migración de células derivadas de monocitos así como en la disrupción de la BHE (Depboylu *et al*, 2011). Éste proceso se caracteriza por la producción de ROS (Strauss, K. 2008). El óxido nítrico (NO) es un radical producido via óxido nítrico sintasa a partir del aminoácido L-arginina como respuesta inmune e inflamatoria. Puede ser producido por tres isoformas de la enzima nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (inducible) (Lu *et al*, 2009). La óxido nítrico sintasa inducible es expresada en respuesta al interferon- γ , a lipopolisacáridos y estímulos inflamatorios (Moncada, S. *et al*, 1991; Yun, H. *et al*, 1996).

Las moléculas proinflamatorias (prostaglandinas y óxido nítrico) producidas por la activación de los astrocitos, desempeñan un papel crítico en las enfermedades inflamatorias; por ello la inhibición de la expresión de COX2 e iNOS es una alternativa para atenuar la respuesta inflamatoria del cerebro (Lu *et al*, 2009).

Factor Nuclear Kappa Beta (NF- κ B) p50/p65

Es un factor ubicuo de transcripción que controla la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, apoptosis y la regulación del ciclo celular. NF- κ B p50/p65 regula las respuestas de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa. El factor de transcripción NF- κ B es un heterodímero p50/p65 que desempeña un papel crítico en las respuestas inmunes e inflamatorias. En las células sin estimular el heterodímero NF κ B p50/p65 existe predominantemente en el citoplasma como una forma de complejo inactivo con la proteína inhibidora de I κ B α . Tras la estimulación, NF κ B p50/p65 se disocia de I κ B α , se transloca al núcleo y se une a un elemento regulador que actúa en cis (sitio kappa B) y activa la expresión génica a través de interacciones con otros factores regulando así diversas funciones celulares (Ghosh, G. et al 2012). Dado que la actividad de NF- κ B es regulada por la interacción con proteínas inhibitorias I κ B que tienen diferentes afinidades por los dímeros de NF- κ B. Este es activado rápidamente en respuesta a una gran variedad de estímulos, incluyendo patógenos, señales de estrés, citoquinas pro-inflamatorias, lipopolisacárido y TNF (Crisostomo, P. et al., 2008). Diferentes estudios han mostrado que la inducción de macrófagos con LPS incrementa la fosforilación y activación de ERK, JNK y p38. Estas MAPKs son una familia de serina/treonina kinasas que juegan roles importantes en diversas cascadas de señalización favoreciendo procesos inflamatorios como la regulación de iNOS y aumento de producción de TNF (Guha, M. & Mackman, N. 2002; Kyriakis, J. & Avruch, J. 2012).

Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α)

También conocido como caquetina es una citoquina pro-inflamatoria producida por varias células entre ellas las neuronas y células glia, desempeñan funciones importantes en la inflamación neuronal, es uno de los mediadores más rápidos y potentes de la respuesta inflamatoria. Aunque su vida media es de apenas 20 minutos, es suficiente para provocar cambios metabólicos y activar otras citocinas (de Oliveira, 2011).

Interleuquina-6 (IL-6)

Es una glucoproteína de 22 a 27 kDa, segregadas por muchos tipos celulares incluidos los astrocitos donde FNT- α y la IL-1 son potentes inductores, es una citoquina pro-inflamatoria que genera la madurez y la activación de los neutrófilos, activa los astrocitos y la microglia, regulando la expresión de neuropéptidos posterior a la lesión neuronal, y contribuyendo así para su regeneración. También ejerce propiedades anti-inflamatorias durante la lesión dado que pueden liberar receptores como FNT (de Oliveira, 2011).

Interleuquina-10 (IL-10)

Es un polipeptido con cerca de 18 kDa, se sintetiza en células inmunológicas y en tejidos neuroendocrinos y neurales. La producción de IL-10 se perjudica por otras citoquinas como la IL-4, OÑ-13 y la IFN γ además de inhibir las citoquinas pro-inflamatorias, principalmente –NT, IL-1 y la IL-6 (de Oliveira, 2011).

Interleuquina – 12 (IL-12)

Es la única que en su estructura tiene 2 cadenas polipeptídicas, su actividad va desde los múltiples efectos sobre las NK (natural killer) y la diferenciación de células T, ayuda en la secreción y síntesis de otras citoquinas, la función más importante de esta interleuquina es la producción del interferón gamma (IFN) porque él es el mediador en la resistencia vírica, fúngica y bacteriana (Sánchez *et al*, 2001).

Interferon gamma (IFN)

Llamado también interferon inmunitario, la función del interferón gamma está centrada en la intervención del macrófago en la inflamación y en la inmunidad adquirida durante la infección. El interferón gamma se encarga de organizar la respuesta de los macrófagos y además también dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK (Natural Killer) y regula la función de las células B (Flynn *et al*, 1993).

Descripción botánica y farmacológica de la especie

Nombre de la especie: *Clusia ellipticifolia* Cuatrec.

Familia: Clusiaceae

Nombres comunes: Capé, copé, Gaque e incienso

Etnobotánica

Su exudado amarillento es usado por su acción cicatrizante y catártica, su corteza es astringente y es muy usada para lavar heridas (Leigh, 2008).

Fitoquímica

A partir de las hojas de *Clusia ellipticifolia*, se elaboraron extractos donde se obtuvo un compuesto puro, se estudió mediante espectroscopia infraroja (IR). Las hojas de esta especie contienen friedelina en una proporción de 0.08%, además, también posee otros compuesto como son los triterpénicos o esteroidales que aún no han sido estudiados a profundidad. También se estudió la resina de esta planta donde se identificaron los compuestos β -amirina por espectroscopia IR, RMN y comparación cromatográfica, y por medio de espectroscopias UV, IR y RMN se identificó isovismiafenona B. (Cuellar, 1982). El autor Betancourt (1982), realizó un extracto de éter petróleo usando los tallos de la planta, fue fraccionado cromatográficamente. Donde se aislaron tres compuestos, que posteriormente con espectroscopia IR y comparaciones cromatográficas sugiere que son β -amirina, β -sitosterol y friedelina. A partir de la resina separada cromatográficamente se aislaron e identificó dos tipos de benzofenonas: vismiafenona B y una nueva benzofenona llamada clusiafenona; para su detección se usaron espectroscopias UV, IR y RMN y reacciones de metilación y de deshidrociclización. González *et al.* (1983) seleccionaron los frutos de la *Clusia ellipticifolia* y señalaron que poseen los siguientes metabolitos secundarios: friedelina, vismiafenona B, isovesmiafenona B y 6-benzoil-5hidroxi-2, 2, 8,8-tetrametil-(2H,8H)benzo(1,2-b:3,4-b')dipiran; siendo esta benzofenona una nueva derivada del floroglucinol. Salama *et al* (1986), detectaron friedelina y friedenol aislado de una muestra con éter petróleo. Benzofenona, Clusiafenonas A, B, C y D; vismiafenona B y isovisafenona B también fueron aisladas de los frutos de estas plantas. Al compuesto

friedelina se le han elaborado estudios farmacológicos y estudios de actividad biológica mostrando su alta efectividad anti-inflamatoria.

Actividades biológicas

Menciones de usos terapéuticos

Antinociceptiva, anti-inflamatoria, bradicardizante, catártica y taquicardizante.

Propiedades biológicas

Ruiz & Hernández (1986) realizaron un estudio preliminar de la acción cardiaca y anti-inflamatoria de los extractos etanólicos, metanólicos y etéreos (éter petróleo) de los frutos y corteza de *Clusia ellipticifolia*. La acción cardiaca se determinó en sapos con técnicas de corazón *in situ*; la acción antiinflamatoria la determinaron en ratas mediante la técnica edema plantar de Winter. Partieron de un extracto seco obtenido a partir del material molido de corteza y fruto a extracción soxhlet con etanol, adicionalmente prepararon extractos secos de metanol y éter petróleo con las cuales realizaron ensayos: los extractos etanólicos presentaron actividad cardiaca como bradicardizante; a su vez el fruto del extracto metanólico presentó actividad cardiaca como taquicardizante. En cuanto a la actividad antiinflamatoria, los extractos etéreos de corteza y fruto presentaron actividad. Salama *et al* (2004), realizó un estudio farmacológico por el modelo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético fue capaz de mostrar actividad anticonceptiva para los compuestos aislados siendo el ácido betulínico la más relevante, Shimizu & Tomoo (1994), al compuesto aislado friedelina se le realizaron estudios farmacológicos y mostraron su alta actividad anti-inflamatoria para el receptor H1.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la capacidad de los extractos de *Clusia ellipticifolia* para regular la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en astrocitos activados con LPS.

Objetivos específicos

-Identificar por medio de un análisis químico preliminar y cromatografías los grupos de metabolitos presentes en los extractos polar y apolar.

-Evaluar la capacidad de los extractos de *Clusia ellipticifolia* para modular la producción de citoquinas y quimioquinas inducida por lipopolisacaridos.

METODOLOGIA

Pruebas químicas

Selección de material

La planta *Clusia ellipticifolia* fue colectada en el sendero ambiental Mogambo ubicado en Viota, Cundinamarca. Para la obtención de la planta correcta, los guías del sendero ofrecieron su colaboración con la identificación del material. Los extractos se realizaron a partir de las hojas,

Secado y molienda

Para el secado, el material se colocó sobre periódico dentro de un extractor por 4 días. Debido a que las hojas de la planta *Clusia ellipticifolia* son gruesas, solamente se dejaron secar al aire libre para evitar que el horno no seque de manera uniforme las plantas pudiéndose perder algunos metabolitos. Al tener el material completamente seco, se procedió a triturar las hojas con un molino de aspas, se tuvo precaución que solo sean las hojas las que pasaran por el molino.

Obtención de extractos vegetales

Para obtener un alto rendimiento del material vegetal, se trabajaron con dos solventes totalmente distintos en polaridad. El primero de ellos es éter petróleo que debido a su naturaleza apolar extrae las sustancias de baja polaridad y grasas, ejemplos de estas serían ácidos grasos, compuestos del tipo terpeno o kaurano. El siguiente solvente es etanol, que

tiene naturaleza polar, extrae compuestos de mediana y alta polaridad entre los que están los flavonoides, cumarinas o glucósidos.

Se extrajo el material vegetal mediante maceración en frío (sólido-líquido), que según los solventes que se usen (éter petróleo y etanol en este caso) separara de una manera selectiva los diferentes compuestos que tenga la planta, para cada extracción se usaron 500 g de material vegetal y se agitó eventualmente para que sea una mezcla homogénea.

Al finalizar la extracción, el contenido se concentró con ayuda de rotavapor para tener el extracto totalmente libre del solvente.

Pruebas químicas preliminares

Se realizaron pruebas concretas de búsqueda de compuestos orgánicos de las dos fracciones (con solvente polar y apolar), para las pruebas apolares se realizaron las pruebas de Lieberman-Burchard (Triterpenos esteroidales), Salkowski (Terpenos), Baljet (Terpenos y esteroides) e Hidroxamato férrico (Sesquiterpenos-lactonas) y para la fracción polar Shinoda (Flavonoides y fenoles), Cloruro férrico (Flavonoides y fenoles), Antrona (Terpenos o Glicosidos de flavonoides), Dragendorff (Alcaloides), Prueba de la espuma (Saponinas) mediante la metodología propuesta por Wall *et al* (1958).

Pruebas cromatográficas

La cromatografía en papel, se utiliza para compuestos muy polares o polifuncionales, el principio de esta técnica se fundamenta en la partición progresiva de la muestra, en donde la fase estacionaria se halla sobre un soporte activo (papel), la fase móvil puede ser variada y al estar en contacto permite una rápida obtención de una distribución de equilibrio de soluto entre ellas. Para el experimento, se usó papel filtro como fase estacionaria y se realizaron 3 cromatografías con diferentes tipos de fase móvil: ácido acético; butanol, ácido acético y agua; ácido clorhídrico, ácido acético y agua.

Adicionalmente, se realizaron dos cromatografías de capa fina en las que se usaron dos tipos de fase móvil. Para la primera de ellas se usó éter petróleo y etanol en una relación 8:2

y para la segunda éter petróleo y acetato de etilo en relación 7:3 respectivamente, para ambos casos se usó silica gel como fase estacionaria, el tener la cromatografía esta se expuso a luz UV a diferentes longitudes de onda, de esta manera permitiéndonos ver posibles compuestos fluorescentes.

La cromatografía en capa fina, es una técnica analítica rápida y sencilla, frecuentemente utilizada en laboratorios de química orgánica, posee la facultad de comparar diferentes muestras en el mismo lapso de tiempo. Adicionalmente, este tipo de cromatografía permite realizar el seguimiento de una reacción, es decir, es posible realizar el estudio de reactivos que desaparecen y ver como aparecen transformados en productos finales. Se fundamenta, en la separación de componentes de una mezcla a través de una migración diferencial sobre una capa fina absorbente, retenida sobre una superficie plana (Sharapin, 2000).

Pruebas biológicas

Cultivo primario de astrocitos

Para la obtención de astrocitos, se usaron ratones neonatos hasta un máximo de 2 días de nacido. Los animales se lavaron con etanol al 70% y se realizaron cortes en el cráneo para extraer el cerebro. Posteriormente se retiraron las meninges, el cerebelo y el budo olfatorio, y se disectaron las cortezas las cuales se colocaron en cajas de Petri con solución salina Hanks (HBSS Lonza) Finalizada la extracción se incubaron con 500uL de tripsina 10X (37°C y 5% CO₂) por 30 minutos. Concluido el tiempo de incubación, el contenido de la caja de Petri se vació en un falcón de 15mL y se centrifugó a 300g durante 5 minutos. A continuación el sobrenadante se descartó y se adicionaron 5 mL de medio DMEM para realizar la disociación mecánica con ayuda de una pipeta plástica de 5mL. Una vez se obtuvo un homogenizado fino, la muestra se filtró usando un strainer de 40µm para retirar fragmentos de tejido que no se disociaron. Finalmente las células se sembraron en cajas T75. Luego del sembrado se dejaron en la incubadora para su óptimo crecimiento. Cada tercer día se cambió el medio y al completar una semana el cultivo se agito durante 4 horas con un shaker a 480 rpm para desprender otros tipos de células no deseadas (oligodendrocitos y microglia). Una vez el cultivo alcanzo una confluencia del se tripsinizaron con tripsina 10X por 10 minutos a 37° y 5% CO₂ para luego ser distribuidas en

otras dos nuevas cajas de Petri T75. Las cuales se mantuvieron hasta llegar nuevamente a una confluencia del 90% para ser tripsinizadas nuevamente para ser usadas posteriormente en los experimentos de viabilidad y de citometría.

Inmunocitoquímica contra GFAP

Para la inmunocitoquímica contra GFAP, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con Poly-D lisina 0.1mg/mL hasta una confluencia del 50%. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS1x pH 7.4 y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, se permeabilizaron con Triton 0.1% y bloquearon con BSA 2% y suero de cabra 10% por 30 minutos. Después, se incubaron con el anticuerpo GFAP toda la noche a 4°C. Finalmente, se montaron en láminas con Pro-Long Gold® que contiene DAPI para colorear los núcleos. Para establecer la pureza del cultivo, se contaron el número de células GFAP positivas y el número de núcleos en 3 campos por triplicado.

Pruebas de viabilidad celular

Para establecer las concentraciones adecuadas de los extractos, se determinó la viabilidad celular por el método colorimétrico con resazurina. Para esto, se sembraron 15.000 astrocitos en placas de 96 pozos los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones de los extractos (1mg, 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg para el extracto polar y 0.02mg, 0.01mg y 0.005mg para el extracto apolar) por 24 horas. Como controles se usaron astrocitos tratados con el vehículo (DMSO 0.1%) y un control negativo (solo DMEM) . Cumplido el tiempo de estimulación, se realizó el ensayo de actividad metabólica mediante Resazurina (Sigma R7017) 44 µM. Este ensayo se fundamenta en que la resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resofurina (rojo altamente fluorescente) por oxido-reductasas que se encuentra principalmente en la mitocondria de las células. Así, la medida de la fluorescencia obtenida de la resazurina es un indicador de la función mitocondrial (Escobar *et al* 2009). Finalmente se dejó encubar nuevamente por una hora. Finalmente se realizó la lectura de la

placa con ayuda del fluorometro usando una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm.

Inducción de la producción de citoquinas y quimioquinas en cultivo primario de astrocitos de ratón por acción de lipopolisacarido (LPS)

Se usaron placas de 24 pozos en las cuales se sembraron 50.000 células por pozo. La placa se incubó a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ se dejaron crecer hasta obtener una confluencia de 80%, posteriormente se adicionó los tratamientos. El primer tratamiento evaluado fue el control negativo; el segundo fue el control del vehículo DMSO al 0.1%, posteriormente se estimuló con LPS 1µg/mL diluido con DMEM durante 24 horas. Pasado el tiempo de estímulo se aplicaron los extractos en las dos concentraciones requeridas 0.005 mg/mL para el extracto polar y 0.0025 mg/mL para el extracto apolar, adicionalmente se agregó LPS 1µg/mL a ambos tratamientos para que el estímulo se mantuviera. Finalmente se realizó control de los extractos adicionando las concentraciones sin LPS y un último control únicamente adicionando LPS. Se dejó nuevamente por 24 horas donde cumplido el tiempo se guardó el medio de cultivo de cada uno de los pozos y se almacenaron a -70°C.

Determinación de las citoquinas y quimioquinas pro- inflamatorias

Se marcaron los tubos de citometria de acuerdo a la lista de trabajo, se incluyeron 10 tubos adicionales para la realización de la curva estándar (s1 a s10). Posteriormente se realizó la curva estándar adicionando en el tubo S1 135 µL de solución diluyente (incluida en el kit CBA) mas 15 µL del estándar. De los tubos S2 a S10 se adicionaron 50 µL de la solución diluyente. Del tubo S1 se extrajeron 50 µL y se adicionaron al tubo S2m se mezcló y se realizó el mismo procedimiento hasta llegar al tubo S9.

Se tomaron 10 µL de la preparación anterior y se añadieron a nuevos tubos, en estos se añadieron 10 µL de sobrenadante de cultivo a cada tubo de muestra. Se tomó un tubo el cual se marcó como ‘mix’ en el cual se realizó la mezcla de perlas de captura y reactivo de detección en PE. Se mezclaron las perlas y se adicionan 10 µL por tubo a analizar incluyendo los 10 tubos de la curva estándar. Del tubo marcado como ‘mix’ se tomaron 20 µL y se añadió a cada tubo de muestra donde se dejó incubar durante 2 horas a

temperatura ambiente protegidos de la luz.

Posterior al tiempo de incubación se adiciono 1 mL de Buffer de lavado (incluido en el kit CBA) donde se centrifugo por 10 min a 1400 rpm, se eliminó sobrenadante y finalmente se adicionaron 300 μ L de lavado a cada tubo para realizar la lectura por el citómetro BD LSR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Pruebas químicas preliminares

A partir de las pruebas químicas preliminares descritas en la tabla 1, se logró obtener para cada una de las muestras un acercamiento sobre el tipo de compuestos que pueda poseer la planta.

Tabla 1. Muestra los resultados de las pruebas químicas preliminares.

Fracción Apolar (Éter petróleo)	
Prueba	Presencia/Ausencia
Lieberman-Burchard (Triterpenos esteroidales)	+
Prueba de Salkowski (Terpenos)	+
Prueba de Baljet (Esteroles)	+

Fracción Polar (Etanol)	
Prueba	Presencia/Ausencia
Shinoda (Flavonoides y fenoles)	+
Cloruro férrico (Flavonoides y fenoles)	+
Antrona (Terpenos o glucósidos)	+
Dragendorff (Alcaloides)	-
Saponinas	-

La prueba Lieberman Burchard dio positiva, el color oscuro se debe que el reactivo reacciona con los OH del compuesto (Burke *et al* 1974), lo que sugiere la presencia de esteroles y esteroides lo cual está de acuerdo por lo realizado por Salama (1986), La prueba Sawlkoski y Baljet son útiles para la detección de terpenos y esteroles, al dar positivo muestra la presencia de estos compuestos. Adicionalmente la prueba baljet permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, como las coumarinas dado que son muy usuales de encontrar en este tipo de plantas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar también positivo este ensayo (Cabrera *et al* 2009).

Los terpenos presentes en la muestra pueden encontrarse en la fuente vegetal solos o formando glicosidos. Estos son frecuentemente triterpenos, aunque hay algunos ejemplos

de glicosidos de terpenos inferiores. Están formados por series de isopreno, y que unidos por cadenas orgánicas forman un grupo de compuestos con características propias y determinan la variedad de los efectos terapéuticos que la planta pueda poseer (de Mercano & Gasegawa, 1991).

En cuanto a las pruebas preliminares con el extracto polar dio positivo para las pruebas shinoda y cloruro férrico, juntas ayudan a detectar la presencia de flavonoides, fenoles o terpenos. La prueba shinoda se fundamenta en que al poner en contacto el ácido clorhídrico con el magnesio metálico se genera hidrogeno, este último reduce al flavonoide desarrollando colores desde rojo al violeta. La prueba antrona, también arrojó resultado positivo y es usada para detectar la presencia de glicósidos, se fundamenta en que la antrona hidroliza los enlaces glicosidicos para dar monosacáridos (Plumeer, 1994)

Los flavonoides son compuestos, generalmente amarillos, que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de diversos azucares (Yufera, 1995). Poseen innumerables aplicaciones a nivel medicinal, desde propiedades anticancerosas hasta propiedades cardiotónicas, actualmente están siendo ampliamente estudiadas.

Cromatografía en capa fina

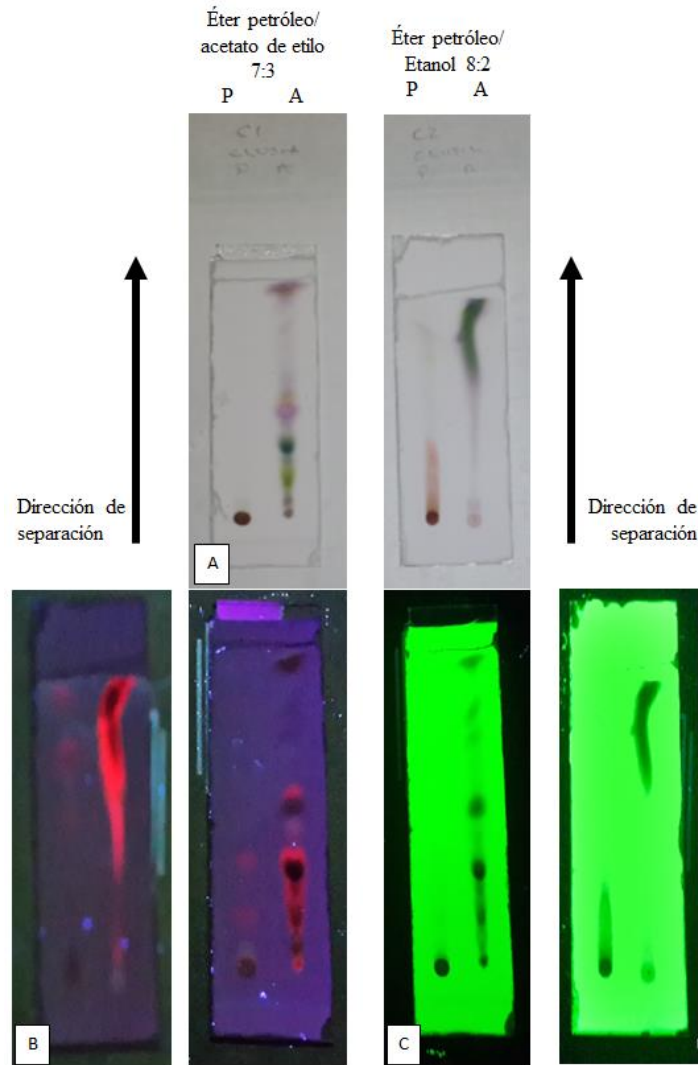


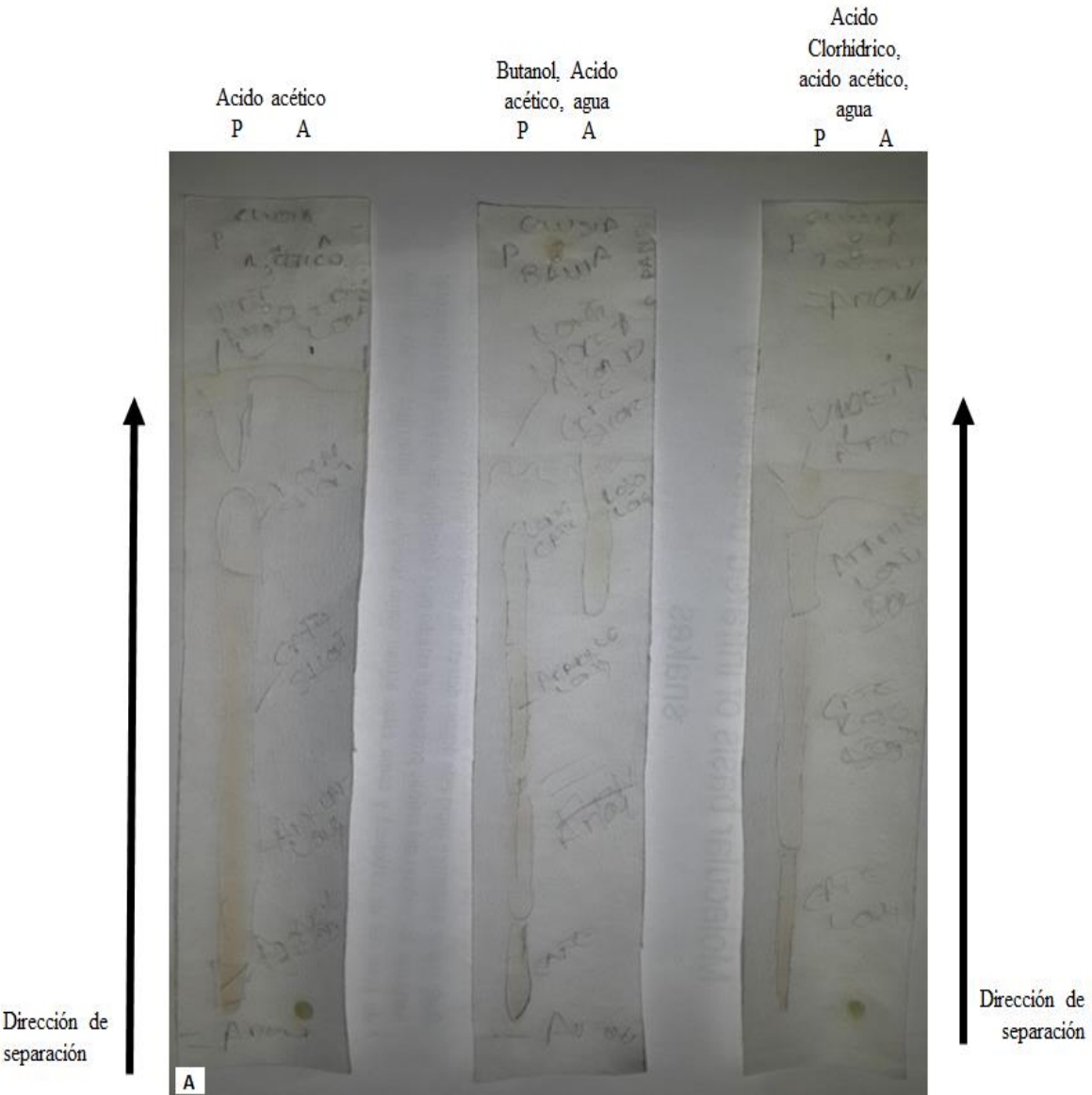
Figura 1. Cromatografías de capa fina de los extractos polar y apolar de la planta *Clusia ellipticifolia*: A) revelado con vainillina B) Revelado con luz Ultra Violeta de longitud de onda larga C) Revelado con luz ultra violeta de longitud de onda corta

A partir de la cromatografía de capa fina de las dos fracciones (fig. 1) se encontraron los diferentes compuestos, se evidencio la presencia de terpenos en la muestra apolar (color morado) (Wagner, 1996). A nivel medicinal el autor Salama y colaboradores (1986) identifico 3 tipos de terpenos (ácido betulinico, friedelinol y friedelina) y realizaron un estudio farmacológico induciendo contorsiones abdominales con ácido acético, mostro gran actividad antinociceptiva principalmente en el ácido betunilico. En la naturaleza estos compuestos se encuentran en un gran número de plantas y estas la usan principalmente para defenderse de los depredadores ya sea alejándolos, matándolos, afectando su metabolismo y retardando maduración. Muchas de estas plantas con estos compuestos son usadas para realizar aromaterapias ya que se dice que ayuda conciliar el sueño y a regular el humor.

Se encontró también la presencia de flavonas y/o flavonoides, estos hallados gracias a la coloración que se encontró (rojo) (Wagner, 1996). Estos compuestos fenólicos son encontrados también en frutas y semillas, se han identificado cerca de 5000 diferentes. En un principio fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron sus múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Martinez *et al* 2002). Otro estudio realizado por Mosquera y colaboradores (2009), mostro que los extractos de plantas de la familia Clusiaceae mostraron gran cantidad de compuestos tipo flavonoides y que estos a su vez mostraron gran actividad antifúngica.

Al hacer observaciones de las muestras con luz UV en dos longitudes de onda distintas se observaron otros compuestos que son fluorescentes dependiendo las diferentes longitudes de onda que se aplique, usando onda corta, se observó el color café-rojo, este puede deberse a la presencia de glicosidos cardiotónicos (Wagner, 1996). Estos medicinalmente se utilizan principalmente para tratar taquicardias y bradicardias supra ventriculares, específicamente para controlar la respuesta ventricular en la fibrilación auricular presente (Payo *et al* 1996; Ruiz & Hernández, 1986).

Cromatografía en papel



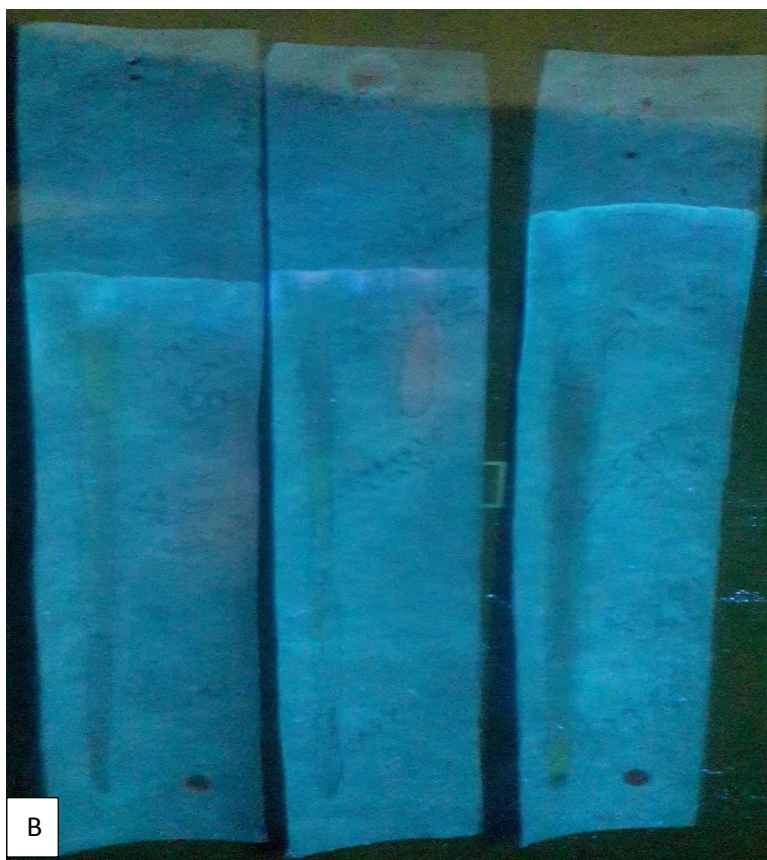


Figura 2. A) Muestra la cromatografía en papel con las tres fases móvil B) Muestra cromatografía con luz ultra violeta a longitud de onda corta.

La cromatografía en papel (figura 2), no mostro mucha disparidad respecto a las cromatografías elaboradas en papel, también se encontraron los colores, café-rojo, verde intenso, amarillo, azul, violeta. Sin embargo se encontró el color anaranjado que también es un color característico de los glicosidos discutidos anteriormente.

2.Determinacion de pureza de los cultivos usados por medio de anticuarpo para GFAP

Con el fin de tener una aproximación de la pureza del cultivo, se realizó una fenotipación de las células aisladas de corteza de cerebro de ratón usando la expresión de (GFAP), la figura 3 A y B muestra únicamente las células positivas para el anticuerpo para GFAP (astrocitos), adicionalmente se marcaron los núcleos (DAPI) de todas las células para poder verificar los datos de pureza, se estimó que la pureza es de aproximadamente 75% de acuerdo al número de núcleos contados y células positivas para GFAP en los campos capturados.

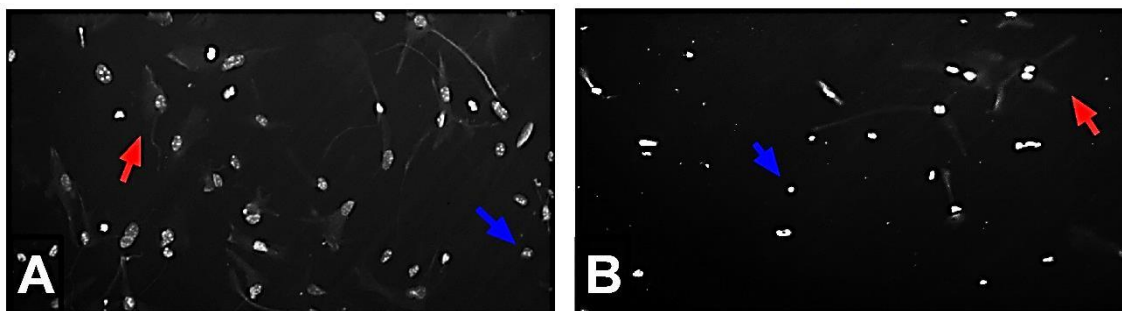


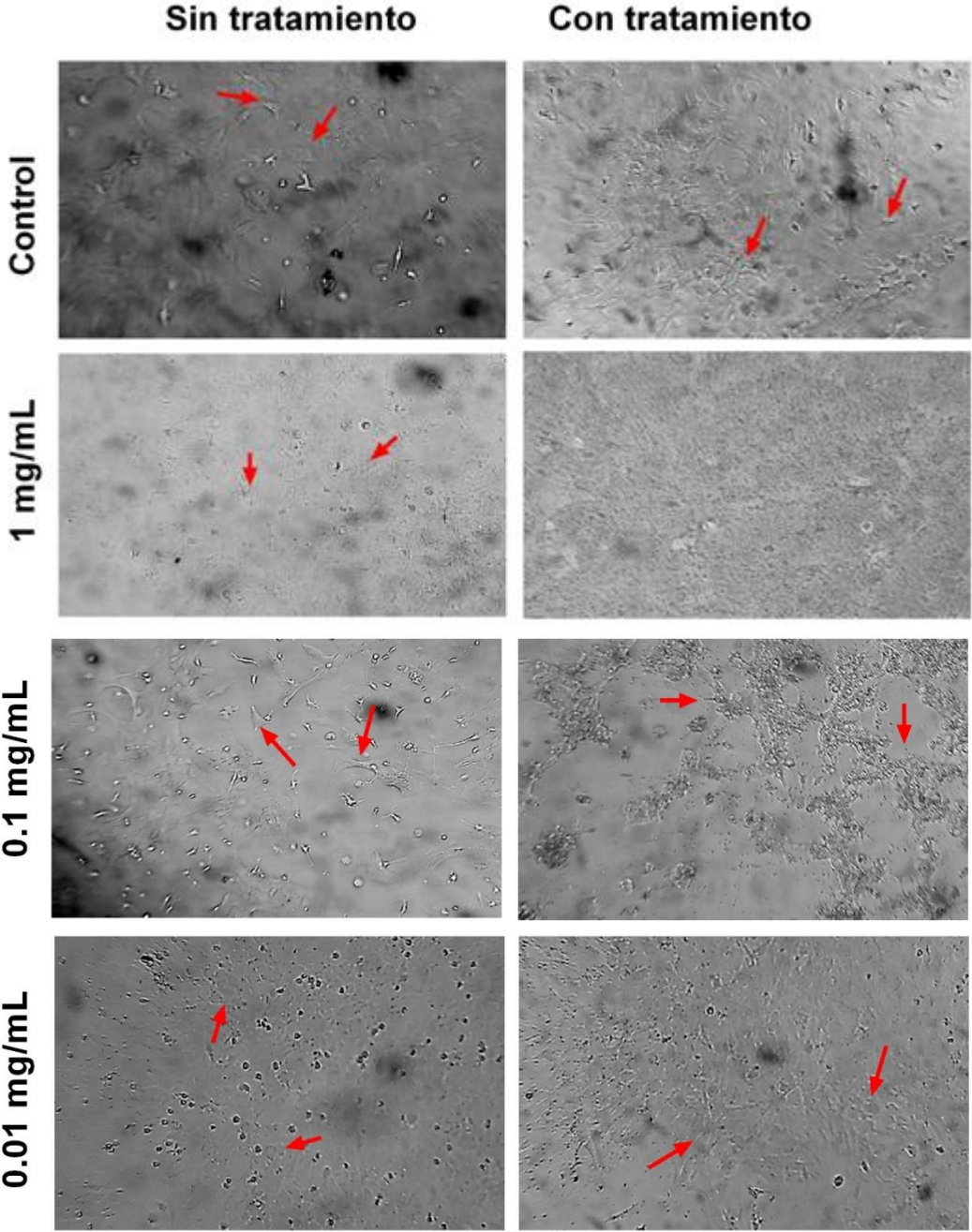
Figura 3. A y B corresponden a diferentes fechas de aislamientos de células, flechas rojas indican astrocitos positivos para GFAP, flechas azules muestran el núcleo (DAPI) de otro tipo de célula existente en el cultivo.

2.1 Curva dosis respuesta del extracto polar y apolar

Antes de evaluar la capacidad que puedan tener los extractos en regular la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por LPS, se hizo una evaluación de la toxicidad de los mismos para evaluar si los extractos podían ser tóxicos y en caso de serlo a que concentraciones es tóxico para las células. Usando el ensayo de fluorescencia con resazurina. Se obtuvo que para las concentraciones polares de 1 (24.73 ± 2.59) y 0.1 mg/mL (66.65 ± 3.01) y apolares de 0.02 (26.64 ± 2.73) y 0.01 (50.32 ± 1.47) mg/mL hubo una

disminución significativa de la viabilidad celular mostrando el efecto letal de los extractos a estas concentraciones (figura 5 y figura 7)

Morfología de las células pre y pos tratamiento del extracto polar



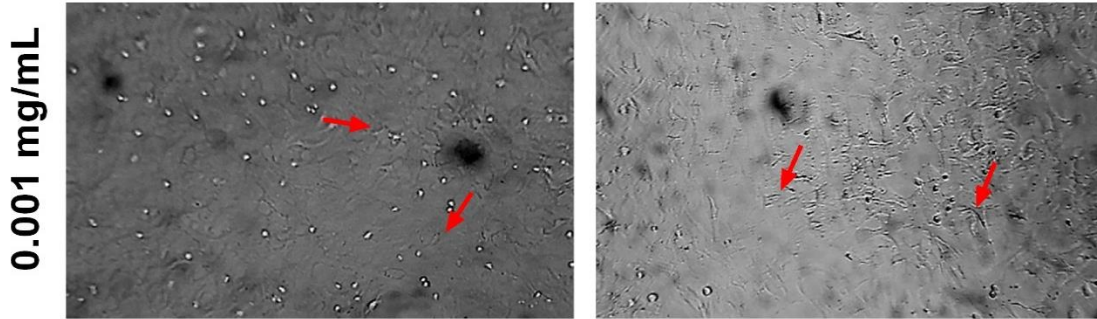


Figura 4. Morfología de los astrocitos antes y después del tratamiento.

Concentraciones extracto polar (1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/mL). Adicionalmente se muestra un control negativo, flechas indicadoras señalan células visibles. Concentraciones 1 y 0.1 mg/mL muestra cambios morfológicos y alta toxicidad de estas dosis.

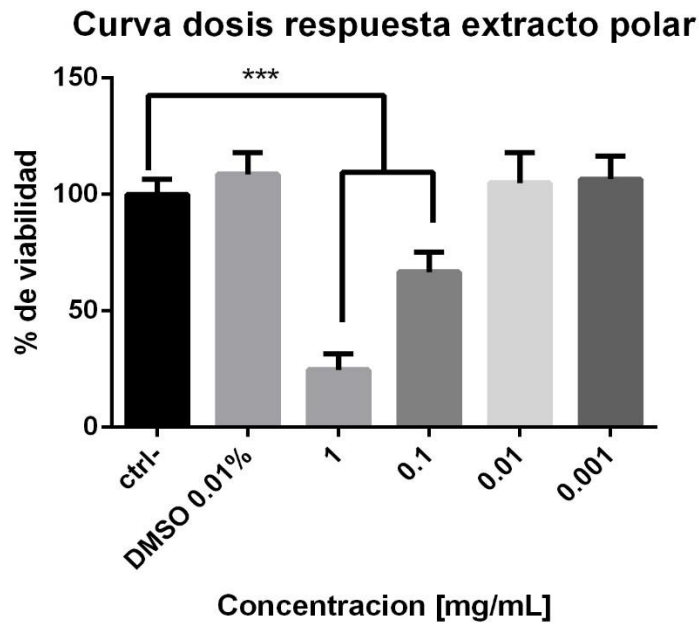
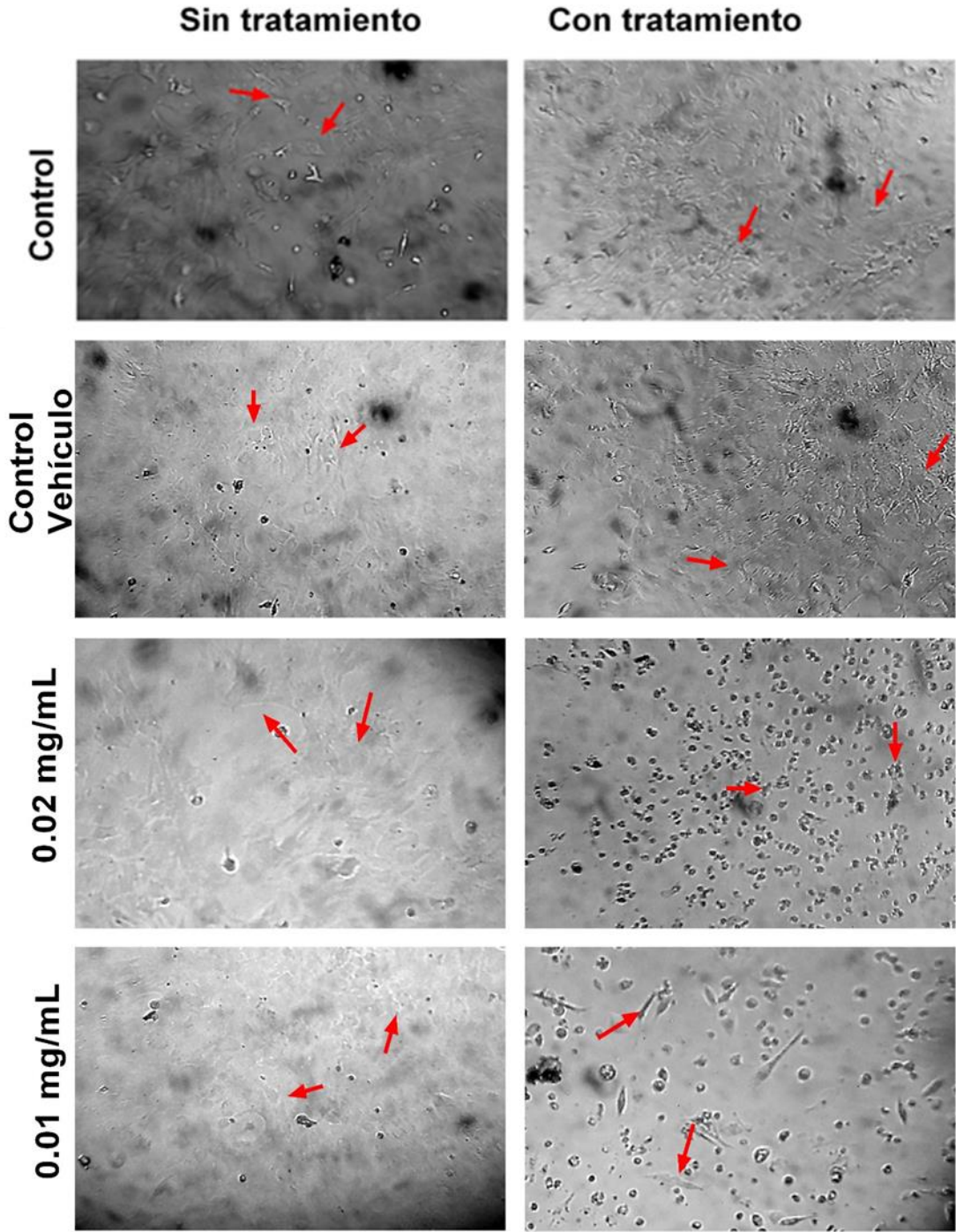


Figura 5. Efecto de los extractos polares de *Clusia ellipticifolia* sobre viabilidad de astrocitos corticales de ratón *in vitro*. La viabilidad se afectó significativamente por los tratamientos usados en las concentraciones de 1 y 0.1 mg/mL, ($P < 0,0001$, Dunnett), las concentraciones de 0.01 y 0.001 mg/mL no mostraron diferencias respecto al control negativo, el control de vehículo DMSO 0.1% no mostro toxicidad en esta concentración. ($n = 4 \times 2$)

Morfología pre y pos tratamiento del extracto apolar



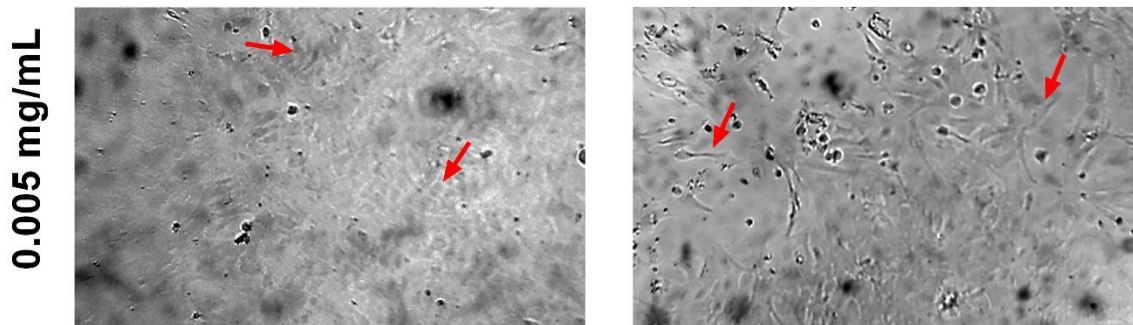


Figura 6. Morfología de los astrocitos antes y después del tratamiento. Concentraciones apolar (0.02, 0.01, 0.005 mg/mL), adicionalmente se muestra un control negativo y un control de vehículo. Los señaladores indican células visibles. Concentraciones 0.02 y 0.01 mg/mL muestra cambios morfológicos y alta toxicidad de estas dosis

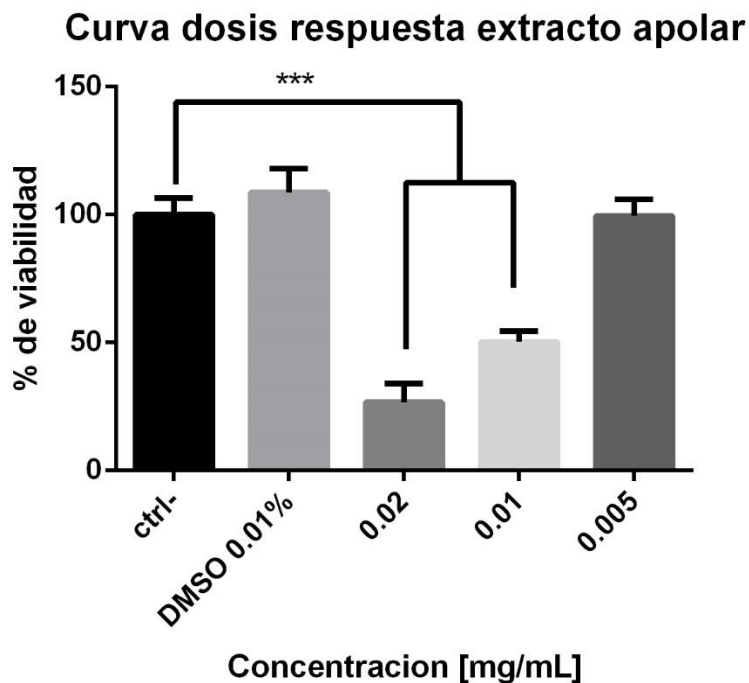


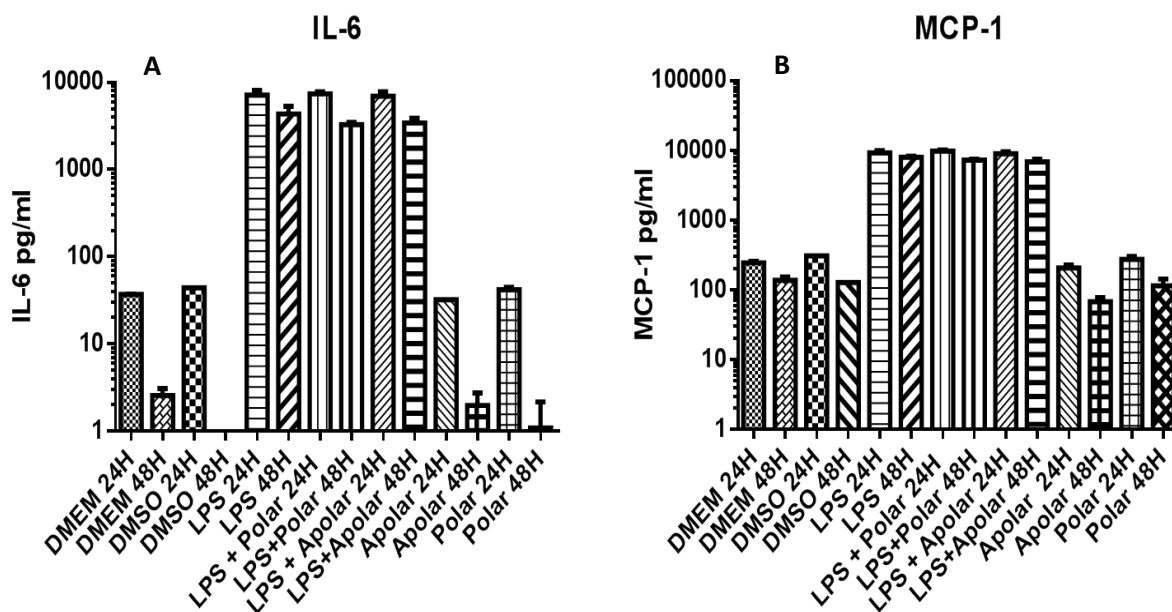
Figura 7. Efecto de los extractos apolares de *Clusia ellipticifolia* sobre viabilidad de astrocitos corticales de ratón *in vitro*. La viabilidad se afectó significativamente por los tratamientos usados en las concentraciones de 0.02 y 0.01 mg/mL, ($P < 0,0001$, Dunnett), la concentración de 0.005 mg/mL no muestra diferencias respecto al control negativo ($P > 0,0001$, Dunnett), el control de vehículo DMSO 0.1% no mostro toxicidad en esta concentración. ($n = 4 \times 2$)

Evaluando el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos sobre la viabilidad de los astrocitos, se obtuvo que las concentraciones 1 (24.73 ± 2.59) y 0.1 (66.65 ± 3.01) mg/mL para el extracto polar y 0.02 (26.64 ± 2.73) y 0.01 (50.32 ± 1.47) mg/mL para el extracto apolar, afectan considerablemente la viabilidad celular. Las figuras 5 y 7. Indican de manera porcentual, como el extracto polar en las concentraciones de 1 y 0.1 mg/mL y apolares de 0.02 y 0.01 mg/mL afectan la viabilidad de las células significativamente. Morfológicamente, Las figuras 4 y 6. Muestran como estas concentraciones altas, las células cambian su forma y tamaño lo que confirma la alta mortalidad que estas concentraciones provocan. De manera contraria, las concentraciones polares de 0.01 (105.0 ± 4.94) y 0.001 (106.5 ± 3.72) mg/mL y apolar de 0.005 (99.56 ± 2.29) mg/mL no muestran ninguna diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular, por ende, estas concentraciones podrían ser usadas para realizar los ensayos de actividad celular, su morfología corresponde con una estructura de una célula viva normal, tampoco hubo cambios evidentes de densidad.

A pesar de que no se hayan hecho estudios de citotoxicidad de un extracto crudo de la especie *Clusia Ellipticifolia*, autores han aislado y realizado curvas dosis-respuesta a diferentes compuestos a otras especies pertenecientes a la misma familia y género (*Clusiaceae* y *Clusia*). Williams y colaboradores, realizaron una curva dosis respuesta al trabajar con el compuesto garcinol sobre una línea celular de cáncer de ovario, demostraron que la IC_{50} para este tipo celular es de $6.8\mu\text{g/mL}$, adicionalmente también aislaron el compuesto friedelina muy común en el género *Clusia* con una IC_{50} de $80\mu\text{g/mL}$. Seo y colaboradores trabajaron sobre la línea celular KB- carcinoma usando el compuesto Vismiaguianona, el cual mostro citotoxicidad en concentraciones mayores a $20\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, contrastando los estudios de los otros autores, se observa que los datos obtenidos en la fig 3. Muestran que en términos de cantidad, los astrocitos mantienen un umbral de viabilidad similar a la de otros grupos celulares, adicionalmente hay que tener en cuenta que en este ensayo se aplicó un extracto grueso y no un compuesto aislado. Cuáles son tus datos da números.

3. Determinación del perfil de citoquinas de astrocitos activados con LPS y tratados con los extractos polar y apolar 0.005 y 0.0025 mg/mL respectivamente.

Al ser activados con LPS los astrocitos empiezan a producir una gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, mediante citometria de flujo se estudiaron cuáles de estas estaban involucradas, y en qué cantidad se expresan en presencia de los extractos polar y apolar en las contracciones 0.005 y 0.0025 mg/mL respectivamente donde los resultados se observan en la figura 8.



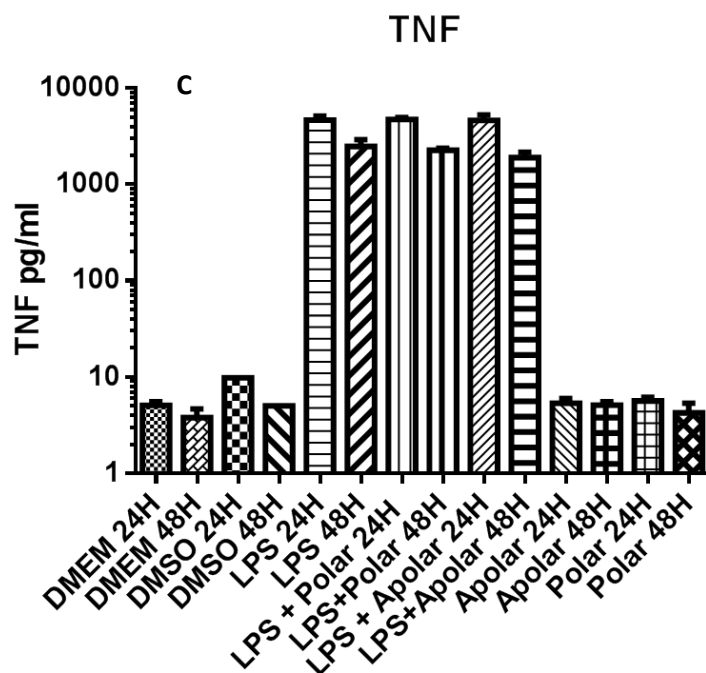


Figura 8. Expresión de citoquinas (pg/mL en astrocitos con activados con LPS a 24 y 48 horas y tratados a partir de la hora 24 con los extractos polar y apolar a 0.01 y 0.005 mg/mL respectivamente. A. IL-6. B. CCL2. C. TNF. ($n = 3 \times 1$), ($P < 0.05$), ANOVA. No hubo diferencias significativas al comparar los tratamientos con el control de LPS

El estado activado de los astrocitos favorece la producción de diferentes tipos de moléculas, que se pueden neurotóxicas al no haber una regulación de las mismas. La citometria de flujo, permitió obtener de una manera detallada las citoquinas y quimioquinas que se expresaron en las células al ser estimuladas con LPS. Aunque el kit permite ver otros tipos de citoquinas y quimioquinas (IL-10, IFN- γ y IL-12), estas no fueron expresadas, lo que se puede decir que los extractos no estimulan la producción de estas, por ende en este estudio se le dio enfoque a las tres de las citoquinas y quimioquinas. La fig. 8 Muestra la concentración en pg/mL, de tres citoquinas expresadas en el experimento (IL-6, CCL2 y TNF). Comparando respecto al control sin LPS, las tres presentan resultados significativos ($P < 0.005$, Tukey), no obstante al aplicar las concentraciones de los extractos no se evidenció cambios significativos en la producción en ninguna de las tres citoquinas

estudiadas respecto al control únicamente con LPS, sin embargo a pesar que la disminución no fue considerable, si se marcó una tendencia a la baja para las tres citoquinas. Por otro lado, se evidenció una disminución significativa de las citoquinas en el control con LPS en el tiempo de 24 a 48 horas de estímulo.

La IL-6, el principal estímulo para su síntesis y liberación son particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y participan a su vez la acción de otras citocinas. Como IL-1 y TNF- α y estas a su vez son reguladas por p38y y quimioquinas como MCP-1 (Lo et al., 2014). Es una citoquina pluripotencial ya que tiene acciones pro-inflamatorias (Deshmane *et al* 2009) como antiinflamatorias, esta acción depende de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de traducción de señales o de la concentración de su receptor (Ramírez *et al* 2011). En la fig 8 A. Solo se puede evidenciar su acción pro-inflamatoria la cual fue inducida por el LPS agregado, mas no se encontró una disminución significativa con las concentraciones usadas.

La quimioquina CCL2 se produce por tanto en células inmune y no inmunes en respuesta a diversos estímulos, incluyendo TNF, IL-1b, IL-4, virus y endotoxinas. La fig. 8 B. muestra el aumento de esta quimioquina CCL2 en el transcurso de 24 a 48 horas, donde a la hora 48 se observó que bajan los niveles de producción de esta, sin embargo el tratamiento control con LPS también bajo en la producción de CCL2 lo que indica que la disminución significativa no es efecto de los extractos vegetales usados. Estudios realizados por Zisman y colaboradores (1997) demostraron que en un modelo *in vivo* la cantidad de CCL2 aumentaban a partir de las dos horas de estimular con LPS, pero que estos con el tiempo bajaban su cantidad, al pasar 48 horas de exposición más del 40% de producción de esta quimioquina había disminuido.

La TNF- α , una molécula pro-inflamatoria potente, es principalmente producida por los astrocitos en el SNC. Durante lesión cerebral o procesos inflamatorios TNF- α se produce mediante activación de los astrocitos donde a su vez se estimula y aumenta la producción de IL6 (Erta et al., 2012; de Oliviera,*et al* 2011) . En un cultivo de astrocitos, la TNF- α es secretada en bajo nivel, sin embargo al ser estimulada con algún inflamatorio aumentan su expresión como lo indica la fig. 8 C. siendo similar a lo reportado por Abd-El-Basse

(2013). Pero de igual manera como sucedió con la IL-6 y CCL2 no hubo ningún efecto de los extractos sobre la cantidad de expresión de la TNF- α , pero igual como se dijo anteriormente, para todas las 3 citoquinas, los extractos marcaron una tendencia a bajar la producción de estas.

Los resultados obtenidos no mostraron una actividad antiinflamatoria significativa, esto pudo deberse a la concentración usada para realizar la modulación de las citoquinas y quimioquinas, también puede deberse al tiempo de exposición de los tratamientos, sin embargo otros autores han usado la planta *Clusia ellipticifolia* para evaluar este tipo de actividad usando otros métodos, Ruíz & Hernández (1986) determinaron la acción antiinflamatoria mediante la técnica de edema plantar, se observó que los extractos etéreos de corteza y fruto junto con el metanólico del fruto, presentaron actividad anti-inflamatoria en la zona afectada. Hong y colaboradores (2006), a partir del compuesto aislado Garcinol, extraído de una representante de la familia Clusiaceae, encontró que 1 μ M de este compuesto modula la expresión de ácido araquidónico y suprime la expresión de iNOS y NO que son agentes potencialmente neurodegenerativos.

CONCLUSIONES

1. La marcha fitoquímica mostró que el extracto apolar posee grupos de metabolitos como son los terpenos, triterpenos esteroidales y esterolés. Por otro lado el extracto polar muestra la presencia fenoles y flavonoides, terpenos y glucósidos y negativo a alcaloides y saponinas, resultados que concuerdan también con lo que se observó en las cromatografías realizadas.

2. A pesar de que en concentraciones bajas los extractos polar y apolar (0.01 y 0.001 mg/mL y 0.005 mg/mL respectivamente) no afectó la viabilidad celular ni su morfología, hubo citotoxicidad con las concentraciones de 1 y 0.1 mg/mL con el extracto polar y de 0.02 y 0.01 con el extracto apolar, también se evidenció un cambio de morfología con estas concentraciones, lo cual puede indicar un cambio en su funcionamiento celular.

3. Las citoquinas y quimioquinas IL-6, CCL2 y TNF- α , se expresan en gran cantidad en 24 horas de estímulo con LPS, al tratar con las concentraciones usadas, no se evidencio algún tiempo de disminución de estas moléculas, sin embargo para el caso de las citoquinas y quimioquinas expresadas, se marcó una tendencia a la disminución. Adicionalmente los extractos no inducen la expresión de las otras citoquinas y quimioquinas estudiadas (IL-10, IFN- γ y IL-12).

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-El-Basse, E. M. (2013). Pro-inflammatory cytokine; tumor-necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibits astrocytic support of neuronal survival and neurites outgrowth. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013.
- Allen NJ & Barres BA. (2005). Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 15(5):542-548
- Betancourt, H.A.I. 1982. Estudio de las sustancias menos polares extraídas de los tallos de *Clusia ellipticifolia*. Tesis. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá, D.C., Colombia. 74 p.
- Bowman, C., Rasley, A., Tranguch, S., & Marriott, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, 43, 281-291.
- Bsibsi, M., Persoon-Deen, C., Verwer, R., Meeuwse, S., Ravid, R., & Van Noort, J. (2006). Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*, 53, 688-695.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* 79 (2):77-89.
- Burke, R. W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, R. A., & Menis, O. (1974). Mechanisms of the liebermann-burchard and zak color reactions for cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(7), 794-781.
- Cabrera, S. P., Torres, D. V., Saavedra, C. M. A., & Morales, C. G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *trichilia hirta* L. *Revista Química Viva*, 8(3)
- Cao L, Fei L, Chang TT, DeLeo JA. (2007). Induction of interleukin-1beta by interleukin-4 in lipopolysaccharide-treated mixed glial cultures: microglial-dependent effects. *J Neurochem.* 102 (2):408-419.
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A. (2012). Oligomers of β -amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Experimental Neurology*, 236(2), 215-227

- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. (2008). [Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism.](#) Am J Physiol Cell Physiol. 294(3): C675-682.
- Cuellar, J.V.M. 1982. Estudio de las sustancias extraídas con éter de petróleo de las hojas de *Clusia ellipticifolia*. Tesis. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá, D.C., Colombia. 64 p.
- de Marcano, D., & Hasegawa, M. (1991). Fitoquímica orgánica Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. Revista Brasileira de Anestesiologia, 61(2), 138-142.
- Depboylu, C., Weihe, E., & Eiden, L. (2011). COX1 and COX2 expression in non-neuronal cellular compartments of the rhesus macaque brain during lentiviral infection. *Neurobiology of Disease* , 42, 108-115.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2): an overview. Journal of interferon & cytokine research, 29(6), 313-326.
- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. International journal of biological sciences,8(9), 1254.
- Escobar, L., Alfonso, P. A., & Aristizábal, F. A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana de Biotecnología*,11(2), 49-56.
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* , 28, 138-145.
- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., & Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of experimental medicine*,178(6), 2249-2254
- Fuller, S., Steele, M., & Münch, G. (2010). Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease- Do they neglect their neurosupportive roles? *Mutation Research* , 690, 40-49.
- Ghosh, G.; Wang, V.; & Huang, A. (2012). NF-κB regulation: lessons from structures. Immunol. Rev., 246, pp. 36-58
- González, G.J.; Cuellar, V. & Pinzón, M. 1983. A benzophenone from the fruits of *Clusia ellipticifolia*. Phytochemistry 22(9): 2088-2090.
- Guha M, Mackman N. (2002). [The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells.](#) J Biol Chem. 277(35):32124-32132.
- Guillamon-Vivancos, T., Gomez-Pinedo, U., & Matias-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description. Neurología (English Edition), 30(2), 119-129.
- Hanisch UK. & Kettenmann H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 10(11):1387-1394.

- Hanisch UK. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 40(2):140-155.
- Hanisch UK. (2013). Proteins in microglial activation--inputs and outputs by subsets. *Curr Protein Pept Sci*. 14(1): 3-15.
- Hashioka, S., Klegeris, A., Schwab, C., & McGeer, P. (2009). Interferon dependent cytotoxic activation of human astrocytes and astrocytoma cells. *Neurobiology of Aging*.30(12): 1924-1935
- Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 117(8): 919-947.
- Heneka MT, O'Banion MK. (2007). [Inflammatory processes in Alzheimer's disease](#). *J Neuroimmunol*. 2007 Mar;184(1-2):69-91
- Hong, J., Sang, S., Park, H. J., Kwon, S. J., Suh, N., Huang, M. T., ... & Yang, C. S. (2006). Modulation of arachidonic acid metabolism and nitric oxide synthesis by garcinol and its derivatives. *Carcinogenesis*, 27(2), 278-286.
- Kaneko YS, Nakashima A, Mori K, Nagatsu T, Nagatsu I, Ota A. (2012). Microglial activation in neuroinflammation: implications for the etiology of neurodegeneration. *Neurodegener Dis*. 10 (1-4):100-103.
- Krifa M., Bouhleb I., Ghedira-Chekir L., Ghedira K. (2013). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Journal of Ethnopharmacology*, 146 (1), 243- 249.
- Kyriakis JM, Avruch J. (2012). [Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update](#). *Physiol Rev*. 92(2):689-737.
- Lau, F., Joseph, J., McDonald, J., & Kalt, W. (2009). Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF-kB activation. *Journal of Functional Foods I*, 274-283.
- Lee CW, Kim SC, Kwak TW, Lee JR, Jo MJ, Ahn YT, Kim JM, An WG. (2012). [Anti-inflammatory effects of bangpungtongsung-san, a traditional herbal prescription](#). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:892943. doi: 10.1155/2012/892943.
- Leigh J. (2008). Cien plantas de uso etnobotánico. Cornare. Antioquia. Colombia
- Lin E, Calvano SE, Lowry SF (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, ;127:117-126.
- Lo, U., Selvaraj, V., Plane, J. M., Chechneva, O. V., Otsu, K., & Deng, W. (2014). p38 [agr](MAPK14) critically regulates the immunological response and the production of specific cytokines and chemokines in astrocytes. *Scientific reports*, 4.
- Lu H, Shi JX, Zhang DM, Wang HD, Hang CH, Chen HL, Yin HX. (2009). Inhibition of hemolysate-induced iNOS and COX-2 expression by genistein through suppression of NF-small ka, CyrillicB activation in primary astrocytes. *J Neurol Sci*. 15(1-2): 91-95.
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(12), 679-689.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(n06)

- Medeiros R., & La Ferla F.M. (2013) Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*, 239 (), 133-138
- Moncada, S., Palmer, R., & Higgs, E. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology Review* , 109-142.
- Mosquera, O. M., Echeverry, L. M., & Osorio, J. N. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica*, 1(41)
- Niranjana R. (2013). The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Focus on Astrocytes. *Mol Neurobiol*.
- Owens, T. (2005). Toll-like receptors on astrocytes: patterning for immunity. *Journal of Neuroimmunology* , 159, 1-2.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestal, Y., & Pekna, M. (2007). The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *International Review of Neurobiology* , 82, 96.
- Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a020628.
- Plummer, D. T. (1994). Introducción a la bioquímica práctica Edicions Universitat Barcelona.
- Raeburn CD, Sheppard F, Barsness K.(2002) – Cytokines for surgeons. *Am J Surg*,183:268-273.
- Ramírez, P. G. S., Duque, G. M. V., & Naranjo, L. A. G. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*, 24(2), 157-66.
- Ruiz, C.C. & Hernández, J. del C. 1986. Estudios preliminares de las acciones cardíaca y antiinflamatoria de *Clusia ellipticifolia*. Tesis. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá, D.C., Colombia. 120 p.
- Salama, A. M. (1986) Aislamiento de friedelina y friedelinol de la corteza de *Clusia ellipticifolia* Cuatr.
- Salama, A.M.; Gamboa, S. & Buitrago, G. 2004. Actividad antinociceptiva de triterpenos aislados de *Clusia ellipticifolia*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 33(2):156-162.
- Sánchez de la Rosa, R., Sánchez de la Rosa, E., & Rodríguez Hernández, N. (2001). Interleucina-12 VS: Enfermedades infecciosas. *Revista Cubana de Medicina*, 40(2), 118-121.
- Satoh, K., Nagano, Y., Shimomura, C., Suzuki, N., Saeki, Y., & Yokota, H. (2000). Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neuroscience Letters* , 221-223.
- Seo, E. K.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry* 2000, 55, 35- 42.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos Convenio Andrés Bello.

- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E. (2007). Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull.* 73(1-3): 55-63.
- Shimizu, M., & Tomoo, T. (1994). Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 17(5), 665-667.
- Sofroniew MV, Vinters HV. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119 (1):7-35.
- Strauss, K. (2008). Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain, Behavior and Immunity* , 22, 285-298.
- Takeuchi Y, Guevara JG. Prevalencia de las enfermedades neurológicas en el Valle del Cauca. *Colombia Médica* 1999; 30
- Tanaka T., & Takahashi R. (2013). Flavonoids and asthma. *Nutrients*, 5 (6), 2128-2143.
- Torrell, G. (2015). Enfermedades neurodegenerativas, AMF. 374-353
- Wagner, H. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas* Springer.
- Wang, D., & Bordey, A. (2008). The Astrocyte Odyssey. *Progress in Neurobiology* , 342-267.
- Weydt P., & Moller T. (2005). Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 16, 527–531.
- Williams, R. B.; Hoch, J.; Glass, T. E.; Evans, R.; Miller, J. S.; Wisse, J. H.; Kingston, D. G. A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. *Planta Med.* 2003, 69, 864-866.
- Xia M, Zhu Y. (2013). FOXO3a Involvement in the Release of TNF- α Stimulated by ATP in Spinal Cord Astrocytes. *J Mol Neurosci.*
- Xia W, Han J, Huang G, Ying W. (2010). Inflammation in ischaemic brain injury: current advances and future perspectives. *Exp Pharmacol Physiol.* 37(2): 253-258.
- Yúfera, E. P. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: De la molécula a la industria* Reverté.
- Yun, H., Dawson, T., & Dawson, T. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology* , 291-316,
- Zisman, D. A., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Tsai, W. C., Bucknell, K., Wilkowski, J., & Standiford, T. J. (1997). MCP-1/CCL2 protects mice in lethal endotoxemia. *Journal of Clinical Investigation*, 99(12), 2832.



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

FACULTAD DE CIENCIAS
Anexo No. 6

Doctora
ANDREA FORERO RUIZ
Directora Carrera de Biología
Facultad de Ciencias

Respetado(a) Doctor(a):

Con la presente comunicación, hacemos constar que el trabajo de grado titulado: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE *CLUSIA ELLIPTICIFOLIA* EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS). realizado por los(as) estudiantes Danny Alexander Garzón Caicedo, ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por los jurados en la sustentación.

En constancia se firma, a los 14 días del mes de diciembre del año 2015.

Cordialmente,

NOMBRE Jorge Robles C.

FIRMA Jorge Robles C.

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Jhon J Sotache

FIRMA Jhon J Sotache

CO-DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Alfonso Barreto

FIRMA Alfonso Barreto

JURADO TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Andrea Forero

FIRMA Andrea Forero

DIRECTOR(A) CARRERA



ANEXO 3
BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE <i>CLUSIA ELLIPTICIFOLIA</i> EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Garzón Caicedo			Danny Alexander			
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Robles Camargo			Jorge Eliecer			
Sutachan Rubio			Jhon Jairo			
FACULTAD						
Ciencias Basicas						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
X						
Nombre del programa académico						
Biología						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Andrea Forero						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Biólogo						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá		2015			45	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X				
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS					
Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co , donde se les orientará).					
ESPAÑOL		INGLÉS			
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					
Resumen					
<p>Durante hemorragias e isquemias, el Sistema Nervioso Central (SNC) responde sistémicamente a las lesiones desarrollando un proceso inflamatorio, que es producto de la activación glial que si perdura conlleva a la degeneración neuronal. Esta activación (microglia y astrocitos) está asociada a cambios morfológicos de estas células, las cuales empiezan un proceso de proliferación y de producción de mediadores pro- y anti-inflamatorio como TNF-α, NO y ROS. Los cuales se ha demostrado son responsable de iniciar y mantener mecanismos neurodegenerativos. Estos cambios se han evidenciado en patologías como el Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral y dolor neuropático.</p> <p>En el presente proyecto se propuso evaluar la capacidad de extractos polar y no polar de <i>Clusia ellipticifolia</i> para regular la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en cultivo primario de astrocitos activados por LPS. Para esto se obtuvieron extractos etanolicos (polares) y etereos (apolares) de hojas de <i>Clusia ellipticifolia</i>. Una vez obtenidos estos extractos se evaluó la toxicidad y la capacidad de regular la activación y expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de astrocitos activados con lipopolisacarido (LPS)</p>					

Se obtuvieron en las pruebas químicas la presencia de los terpenos, triterpenos esteroidales y esteroides en el extracto apolar y fenoles y flavonoides, terpenos y glucósidos en el extracto polar, se evidenció toxicidad sobre las células en las concentraciones polares de 1 y 0.1 mg/mL y apolares de 0.02 y 0.01 mg/mL finalmente, al inducir con LPS se expresaron IL-6, TNF y CCL2, sin embargo no hubo efecto significativo de los extractos sobre la modulación de estas citoquinas y quimioquinas.

Abstract

During hemorrhage and ischemia of the central nervous system (CNS) responds to injury. Developing systemically inflammatory process, which is the product of glial activation remains leads to neuronal degeneration. This activation (microglia and astrocytes) are associated with morphological changes of these cells, which begin a process of proliferation and production of pro-inflammatory mediators and anti-such as TNF- α , NO and ROS. Which he has been proven responsible for initiating and maintaining neurodegenerative mechanisms. These changes have been shown in diseases such as Alzheimer's, Parkinson, lateral sclerosis and neuropathic pain.

The purpose of this project was to evaluate the ability of polar and non-polar extracts of *Clusia ellipticifolia* to regulate the production of cytokines and pro-inflammatory chemokines in primary culture of LPS-activated astrocytes. First of all, the ethanol extracts (polar) and ethereal (nonpolar) *ellipticifolia Clusia* leaves were obtained. Once these extracts obtained toxicity and the ability to regulate the activation and expression of pro-inflammatory cytokines in activated astrocytes model with lipopolysaccharide (LPS) was evaluated.

The presence of terpenes, steroidal triterpenes and sterols in the apolar extract and phenols and flavonoids, terpenes and glycosides in the polar extract obtained in chemical tests, toxicity on cells in polar concentrations of 1 and 0.1 mg/mL was evidenced and apolar 0.02 and 0.01 mg/mL finally LPS to induce IL-6, TNF and CCL2 is expressed, but no significant effect of the extracts on the modulation of these cytokines and chemokines.

ANEXO 2

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES
(Licencia de uso)

Bogotá, D.C., 14 diciembre de 2015

Señores
Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.
Pontificia Universidad Javeriana
Cuidad

Los suscritos:

Danny Alexander Garzón Caicedo , con C.C. No 1014219433
_____, con C.C. No _____
_____, con C.C. No _____

En mi (nuestra) calidad de autor (es) exclusivo (s) de la obra titulada:
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REGULADORA DE EXTRACTOS DE *CLUSIA ELLIPTICIFOLIA* EN LA
PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN ASTROCITOS ACTIVADOS
CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

Tesis doctoral Trabajo de grado Premio o distinción: Sí No

cual: presentado y aprobado en el año 2015 , por medio del presente escrito autorizo
(autorizamos) a la Pontificia Universidad Javeriana para que, en desarrollo de la presente licencia
de uso parcial, pueda ejercer sobre mi (nuestra) obra las atribuciones que se indican a
continuación, teniendo en cuenta que en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar,
difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente
licencia se autorizan a la Pontificia Universidad Javeriana, a los usuarios de la Biblioteca Alfonso
Borrero Cabal S.J., así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los
que la Universidad tenga perfeccionado un convenio, son:

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La conservación de los ejemplares necesarios en la sala de tesis y trabajos de grado de la Biblioteca.	X	
2. La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca)	X	
3. La consulta electrónica - on line (a través del catálogo Biblos y el Repositorio Institucional)	X	
4. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer	X	
5. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet	X	
6. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previo convenio perfeccionado con la Pontificia Universidad Javeriana para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de

acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

De manera complementaria, garantizo (garantizamos) en mi (nuestra) calidad de estudiante (s) y por ende autor (es) exclusivo (s), que la Tesis o Trabajo de Grado en cuestión, es producto de mi (nuestra) plena autoría, de mi (nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy (somos) el (los) único (s) titular (es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Pontificia Universidad Javeriana por tales aspectos.

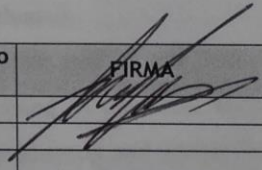
Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Pontificia Universidad Javeriana está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: Información Confidencial:

Esta Tesis o Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de una investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. Si No

En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta, tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

NOMBRE COMPLETO	No. del documento de identidad	FIRMA
Danny Alexander Garzón Caicedo	1014219433	

FACULTAD: Ciencias Básicas

PROGRAMA ACADÉMICO:

Biología