



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

# **Estudio de propiedades anti-inflamatorias de extractos foliares de dos genotipos de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) en fibroblastos cardiacos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**DIANA ALEJANDRA FIGUEROA LARROQUE**

**Directora y Patrocinante**  
**Dra. Lorena García Nannig**

Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Laboratorio de Transducción  
de Señales Moleculares

**Directora**  
**Dra Carla Delporte Vergara**

Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica  
Laboratorio de Productos  
Naturales

Santiago de Chile, 2015

*Amar la trama más que el desenlace*

## Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a mis padres, Guillermo y Katy, por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de esta carrera y de la vida. Creo que nunca podré expresar con palabras lo agradecida que me siento de tenerlos y de ser su hija. A mi hermano Rafael y Juanita, a Charlotte y Gloria, siempre presentes en nuestras vidas.

A las grandes personas que me acompañaron durante el desarrollo de esta tesis: mis directoras, profe Carla Delporte y profe Lorena García, que me apoyaron durante el transcurso de esta travesía insospechada con excelente disposición y paciencia, con células o sin ellas. A mis compañeros y amigos del laboratorio de productos naturales, mi punto de partida: Italo, Marcelo, Paula, Rodrigo, Dani, Rubén, Zita, Jorge (aka el team murtilla), Pame, Gabi, Ale, Cata, Pao y David, presentes en interminables seminarios matutinos y otras reuniones sagradas. Y, por su puesto, a mi segundo hogar-laboratorio, con Hugo, Apus, Moni, Vale, Tere y Eliseo, amigos y maestros en el quehacer diario, a Don Fidel y la Sra Gindra, y a nuestros vecinos de laboratorio. Creo que el trabajo nunca habría sido tan ameno sin ellos.

El paso por la universidad fue mucho más que este año de tesis, por eso también quiero recordar a Lauri y las niñas, a Vane, a Tito, a los chicos de lodmec y a todos los amigos, compañeros y maestros con los que compartí durante estos – muchos – años universitarios. Y porque no todos los desafíos fueron de laboratorio, quería también mencionar a Francisca y Polet, que aunque no lo crean hicieron posible que esto resultara.

Por último quiero agradecer a Aliosha, mi compañero y amigo. En las buenas, las malas y las peores, no puedo agradecerte lo suficiente por estar siempre presente. Las celulitas y las piedras.

Como decía Meme, tout va bien qui finit bien

Gracias

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
FINANCIAMIENTO .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN .....	IX
SUMMARY .....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
3.1. Objetivo general.....	7
3.2. Objetivos específicos.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
4.1. Materiales .....	8
4.1.1. Reactivos y material de cultivo celular .....	8
4.1.2. Soluciones .....	9
4.2. Métodos .....	11
4.2.1. Confirmación botánica de la especie vegetal. ....	11
4.2.2. Cultivo celular.....	13
4.2.3. Protocolo de estímulos.....	13
4.2.4. Ensayo de viabilidad celular .....	14
4.2.5. Western blot .....	14
4.2.7. Cuantificación de producción de nitrito por reacción de Griess. ....	17
4.3 Análisis estadístico .....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Análisis morfológico del material vegetal .....	19
5.2. Viabilidad celular .....	20
5.3. Inmunodetección mediante Western blot de mediadores inflamatorios .....	21
5.3.1. Subunidad p65 de NF- $\kappa$ B.....	21
5.3.2. IL-1 $\beta$ .....	21

5.3.3. COX-2 .....	24
5.3.4. VCAM-1 .....	24
5.4. Cuantificación de la producción de nitrito. ....	27
5.5. Cuantificación relativa de la actividad de MMP-9.....	27
6. DISCUSIÓN .....	30
7. CONCLUSIONES .....	33
8. PROYECCIONES Y LIMITACIONES .....	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
10. ANEXOS.....	39

## FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT N° 1130155 (Dra. Carla Delporte, investigadora responsable; Dra. Lorena García Nannig, co-investigadora).

Proyecto FONDAP ACCDiS (Advanced Center for Chronic Diseases) N° 15130011 (Dra. Lorena García Nannig, investigadora asociada).

Esta memoria de título fue realizada en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Esta memoria dio origen a las siguientes presentaciones a congreso:

**Figuroa D**, Díaz H, Peña M, Arancibia J, Delporte C, García L. Evaluación de parámetros inflamatorios de extractos foliares obtenidos de dos genotipos de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) en fibroblastos cardiacos. III Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. 12-14 de agosto, 2015. Iquitos, Perú.

**Figuroa D**, Díaz H, Peña M, Arancibia J, Delporte C, García L. Evaluation of inflammatory parameters of foliar extracts of two genotypes from murtila (*Ugni molinae* Turcz.) in cardiac fibroblasts. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 22-25 de septiembre, 2015. Puerto Varas, Chile.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Triterpenoides pentacíclicos identificados en las hojas de <i>Ugni molinae</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Principales compuestos polifenólicos identificados en las hojas de <i>Ugni molinae</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Hojas y frutos de <i>Ugni molinae</i> silvestre (Peña, 2011) y hojas secas del genotipo 22-1 de <i>Ugni molinae</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Cultivos de genotipos de murtila en el INIA de Carillanca, Temuco.....	12
<b>Figura 5.</b> Procedimiento de extracción seriada de las hojas de <i>Ugni molinae</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Testigos herbarios de <i>Ugni molinae</i> , genotipos 22-1 y 23-2.....	19
<b>Figura 7.</b> Viabilidad celular por ensayo de MTT.....	20
<b>Figura 8.</b> Efecto de los extractos sobre la activación de la subunidad de p65 de NFκB.....	22
<b>Figura 9.</b> Nivel proteico de IL-1β por efecto de los extractos.....	23
<b>Figura 10.</b> Nivel proteico de COX-2 por efecto de los extractos.....	25
<b>Figura 11.</b> Nivel proteico de VCAM-1 por efecto de los extractos.....	26
<b>Figura 12.</b> Efecto de los extractos sobre la actividad de MMP-9.....	28
<b>Figura 13.</b> Efecto de los extractos sobre la concentración de nitrito en el sobrenadante.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Triterpenoides pentacíclicos descritos en <i>Ugni molinae</i> con propiedades de efectos antiinflamatorio.....	4
<b>Tabla 2.</b> Perfil de triterpenoides encontrados en las hojas de <i>Ugni molinae</i> en los genotipos seleccionados.....	6
<b>Tabla 3.</b> Fenoles totales encontrados en las hojas de <i>Ugni molinae</i> en los genotipos seleccionados.....	6
<b>Tabla 4.</b> Efecto antiinflamatorio por vía oral de los EET22-1, EAE23-2 y de la indometacina en el modelo de inflamación inducido por TPA.....	13
<b>Tabla 5.</b> Composición gel separador y concentrador para Western blot.....	15
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.....	16
<b>Tabla 7.</b> Composición gel separador y concentrador para zimografía.....	17

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Rendimiento del procedimiento de extracción seriada de las hojas de <i>Ugni molinae</i> en los genotipos seleccionados.....	39
---	----

## ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

A/BA: acrilamida/bisacrilamida

AINEs: analgésicos antiinflamatorios no esteroideos

CFT: contenido de fenoles totales

CLAE-DAD: cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de fotodiodos

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

EA: efecto antiinflamatorio

EAE: extracto de acetato de etilo

EAG: equivalencia en ácido gálico

EDCM: extracto en diclorometano

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EET: extracto etanólico

EHE: extracto hexánico

FBS: suero fetal bovino

FC: fibroblastos cardiacos

IgG: inmunoglobulina G

INIA: instituto de investigaciones agropecuarias

IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 $\beta$

IL-1: interleuquina 1

IL-6: interleuquina 6

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LPS: lipopolisacáridos de *Escherichia coli*

MEC: matriz extracelular

MMP-2: metaloproteinasa-2

MMP-9: metaloproteinasa-9

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF $\kappa$ B: factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B

NO: óxido nítrico

PBS: tampón fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG: prostaglandinas

PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>

RIPA: amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

TBS: tris salino tamponado

TLR4: receptor tipo Toll 4

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

5-LOX: 5-lipooxigenasa

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares se caracterizan por una desregulación del proceso inflamatorio, el que se perpetúa por activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y sobreproducción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y prostaglandinas, entre otros. Los fibroblastos cardiacos (FC) son un tipo celular crucial en la mantención estructural y funcional del tejido cardiaco ya que actúan como “células centinelas”, censando el ambiente proinflamatorio, y produciendo matriz extracelular (MEC) para reparar el daño tisular después de una injuria al corazón. El rol de los FC se ha estudiado en sepsis y es relevante en patologías asociadas a fibrosis e inflamación.

*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae, es un arbusto nativo del centro y sur de Chile y de zonas aledañas de Argentina. Sus hojas se han utilizado en la medicina tradicional como antiinflamatorio y analgésica de las vías urinarias. Sus extractos foliares, como los de acetato de etilo y etanólico, tienen efectos farmacológicos comprobados tales como actividad analgésica y antiinflamatoria *in vivo*, y por otro lado capacidad antioxidante y actividad antibacteriana sobre microorganismos de interés clínico, entre otros. Estas propiedades son atribuidas a la presencia de triterpenos pentacíclicos y compuestos fenólicos. La gran variedad genotípica que caracteriza a esta especie es responsable de los diferentes perfiles químicos de los extractos foliares de murtila.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de extractos de hoja de dos genotipos distintos de murtila, EET22-1 (extracto etanólico del genotipo 22-1) y EAE23-2 (extracto de acetato de etilo del genotipo 23-2), sobre la viabilidad celular, y mediadores pro inflamatorios regulados por NF $\kappa$ B en FC.

Los EET22-1 y EAE23-2 se prepararon a partir de hojas secas y molidas por extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente como hexano, diclorometano acetato de etilo y etanol de dos genotipos elegidos por su mayor capacidad antiinflamatoria *in vivo* y su capacidad antioxidante. El cultivo primario fue de FC de rata neonata, mantenido en medio DMEM/F-12 con FBS 2%. Las células se estimularon con LPS 1 $\mu$ g/mL por 24 horas en ausencia y presencia de extracto (0,1-1-10 y 100  $\mu$ g/mL). Se determinaron a) viabilidad celular por MTT, b) niveles proteicos de p65, IL-1 $\beta$ , COX-2 y

VCAM-1 por Western blot, c) actividad de MMP-9 por zimografía y d) concentración de nitrito por reacción de Griess.

Ambos extractos mantuvieron viabilidad celular hasta los 10 µg/mL, sin embargo esta disminuyó significativamente con 100 µg/mL de EAE23-2, y 500 µg/mL de EET22-1, en relación al control sin extracto; esta diferencia se atribuye a las diferencias de composición química entre ambos extractos. No se observó una disminución significativa para los grupos pre y post tratado, respecto al control LPS, en ninguno de los parámetros evaluados por Western blot a excepción del grupo pre tratado con la mayor concentración de EET22-1 para VCAM-1. Se observó un aumento en la actividad de MMP-9 en la mayoría de las condiciones. No se pudieron validar los resultados obtenidos para la cuantificación de nitrito a las 24 horas.

Los dos extractos mantuvieron la viabilidad celular a concentraciones bajas y medias, siendo EET22-1 menos citotóxico a altas concentraciones. Ninguno de los extractos pudo disminuir significativamente los mediadores evaluados en este modelo celular, a las 24 horas, aunque los extractos solos no demostraron aumentar los estímulos inflamatorios a concentraciones bajas y medias. Se observó una tendencia al aumento en la actividad de MMP-9 en la mayoría de las condiciones estudiadas, lo que podría apuntar a una posible actividad antifibrótica de los extractos; son necesarias más pruebas para apoyar esta idea.

## SUMMARY

Study of anti-inflammatory properties of leaves extracts of two genotypes of murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) in cardiac fibroblasts.

Cardiovascular diseases are characterized by a desregulated inflammatory process, which is kept on by the activation of transcriptional factor NF- $\kappa$ B and overproduction of pro-inflammatory mediators like TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and prostaglandins, among others. Cardiac fibroblasts (CF) are a crucial cellular type in the structural and functional maintenance of the cardiac tissue, by acting like “sentinel cells”, censoring the pro-inflammatory environment and producing extracellular matrix (ECM) for the repair of tissue damage after cardiac injury. The CF role has been studied in sepsis, and its relevant in pathologies associated with fibrosis and inflammation.

*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae, is a native bush from the centric and southern areas of Chile and adjacent areas from Argentina. Its leaves have been used in traditional medicine as anti-inflammatory and analgesic of the urinary tract. Leaves extracts, like the ethanolic extract and the ethyl acetate extract, have proven pharmacological effects, like *in vivo* analgesic and anti-inflammatory activity, antioxidant capacity and antibacterial activity on microorganism of clinical interest, among others. These properties are attributed to the presence of pentacyclic triterpenoids and phenolic compounds. The great genotypic variety which characterizes this species is responsible for the different chemical profiles of the leaves extracts of murtilla.

This studies aim was to evaluate the effects of the leaves extract of two different genotypes of murtilla, EET22-1 (ethanolic extract of genotype 22-1) and EAE23-2 (ethyl acetate extract of genotype 23-2), on the cellular viability and pro-inflammatory mediators regulated by NF $\kappa$ B in CF.

EET22-1 and EAE23-2 were prepared from the dry and minced leaves by successive extractions with growing polarity solvents like hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol from the genotypes selected for their *in vivo* anti-inflammatory capacity and antioxidant capacity. The primary culture from CF of neonatal rat was maintained with DMEM/F-12 medium with FBS 2%. The cells were stimulated with LPS

1 µg/mL for 24 hours in absence or presence of the extracts (0,1-1-10 y 100 µg/mL). Determinations were made for a) cellular viability by MTT assay, b) protein levels of p65, IL-1β, COX-2 and VCAM-1 by Western blot, c) MMP-9 activity by zymography and d) nitrite concentration by Griess reaction.

Both extracts maintained cellular viability till 10 µg/mL, nevertheless it decreased significantly at 100 µg/mL EAE23-2, and 500 µg/mL EET22-1, related to the untreated control; this difference was attributed to the differences in chemical composition between the extracts. It was not observed a significant decrease for the pre and post treated groups, compared with the LPS control, in any of the Western blot evaluated parameters, except for VCAM-1's pretreated group with the larger concentration of EET22-1. MMP-9 showed an increased activity in most conditions, while the nitrite assays couldn't be validated at 24 hours.

The extracts maintained cellular viability at low and medium concentration, with EET22-1 being less cytotoxic at higher concentrations. The extracts couldn't decrease significantly the evaluated mediators, at 24 hours, but the extracts without LPS did not increase the inflammatory stimulus at low and medium concentrations. It was observed an upward trend in the MMP-9 activity in most of the studied conditions, which could point to a possible anti fibrotic activity of the extracts; more test are needed to support this idea.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que cursan con inflamación son un grupo heterogéneo de patologías, entre las que se encuentran la aterosclerosis, enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn y diabetes mellitus, entre otras (Sung y cols., 2012). Difieren entre ellas en cuanto a sus índices de mortalidad y morbilidad, pero todas afectan la calidad de vida de quienes las padecen y, por lo tanto, son de gran interés desde el punto de vista de salud pública.

El proceso inflamatorio se puede iniciar por la presencia de patógenos o por daño tisular, y se caracteriza por la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) o IL-1 $\beta$  (interleuquina-1 $\beta$ ), y mediadores como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG) y proteínas de adhesión como VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1). Alteraciones en las fases de resolución y reparación, así como la persistencia del estímulo iniciador, alteran la secuencia normal de inflamación asociada a un fenómeno reparativo, para convertirse en un proceso crónico patológico, que se potencia con el daño tisular ya acumulado, junto con fibrosis y angiogénesis (Chapman y cols., 2013).

En la cadena inflamatoria no solo están involucradas las células del sistema inmune, sino que también otros tipos celulares, como los fibroblastos. Estas células están presentes en una amplia variedad de tejidos como muscular, gingival, hepático, renal, pulmonar y cardiaco, entre otros (Rockey y cols., 2015; Ogata y cols., 2006). Los fibroblastos están involucrados en la síntesis de matriz extracelular (MEC), remodelación y reparación de lesiones (Luo y cols., 2015), y además, tienen un rol en el proceso inflamatorio, secretando citoquinas proinflamatorias (Lu y cols., 2015; Sandanger y cols., 2013) y produciendo PGE<sub>2</sub> en respuesta a mediadores como bradikinina, histamina, IL-1, TNF- $\alpha$  y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Ogata y cols., 2006). Además, hay evidencias de expresión del receptor tipo Toll 4 (TLR4) en, al menos, fibroblastos cardiacos (Sandanger y cols., 2013). TLR4 participa en la respuesta inmune innata, y se sabe que reconoce especialmente a lipopolisacárido (LPS), tras lo cual ocurre una producción y liberación de citoquinas inflamatorias vía la translocación nuclear de NF $\kappa$ B (Factor nuclear  $\kappa$ B). También, hay evidencias de que median la expresión de proteínas de adhesión como VCAM-1, en fibroblastos gingivales humanos (Liu y cols.,

2015), la cual cumple un rol en la etapa de extravasación de células del sistema inmune al sitio del daño. En el proceso de migración celular a la zona del daño también es fundamental la presencia de metaloproteinasas (MMPs), gracias a las cuales se facilita la migración de fibroblastos, además de degradar MEC. Considerando lo anterior, si el estímulo iniciador persiste, la sobreproducción de proteínas de MEC como colágeno (Lu y cols., 2015), junto con los demás mediadores ya mencionados llevarán a la remodelación del tejido de soporte del órgano y la inflamación, que se asocian a las enfermedades inflamatorias crónicas, angiogénesis y carcinogénesis (Sbaizero y cols., 2015; Luo y cols., 2015).

Los fibroblastos cardiacos son los mayores constituyentes celulares del corazón: ayudan a mantener la integridad del órgano (Sbaizero y cols., 2015; Chen y Frangogiannis, 2013), y son sensores intermediarios y amplificadores de señales inflamatorias. Se sabe que la estimulación con LPS aumenta la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9 y NO en fibroblastos cardiacos adultos, y son de importancia patogénica en la inflamación y fibrosis que ocurre en el corazón durante la sepsis (Tomita y cols., 2015). El funcionamiento anormal de este tipo celular está directamente implicado en patologías como hipertensión, insuficiencia cardiaca y el daño por infarto (Brown y cols., 2005; Fan y cols., 2012).

En el arsenal farmacológico antiinflamatorio están los analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), el grupo de mayor uso (De Argila, 2008) y cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de ciclooxigenasas (COX), enzimas que catalizan el paso limitante en la producción de PG en la respuesta inflamatoria (Hseu y cols., 2005; Tsatsanis y cols., 2006). La isoforma constitutiva de esta enzima, COX-1, tiene un rol protector a nivel gastrointestinal, por lo que el uso continuado de AINEs clásicos, como aspirina, naproxeno o indometacina, lleva a daño gastrointestinal severo (Mehta & Bhargava, 2010). En cambio, el uso de inhibidores selectivos de la isoforma inducible, COX-2, reduce considerablemente los efectos gastrointestinales no deseados (Choi & Hwang, 2005) en comparación con los AINEs clásicos. La búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios, efectivos y seguros, es una tarea permanente. Las plantas utilizadas por la medicina folclórica pueden ser una fuente de nuevos compuestos antiinflamatorios, que deben ser estudiados, como por ejemplo las hojas de murta.

La especie vegetal *Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae, también conocida como murta, murtillo o uñi, es un arbusto nativo de las zonas boscosas litorales del centro y sur de Chile, y zonas aledañas de Argentina. Es de fácil domesticación por su adaptabilidad a suelos poco fértiles y condiciones climáticas (Pastenes, 2002; Seguel y cols., 2000). Se cultiva por sus frutos: bayas globosas de color rojo intenso que se utilizan en la preparación de conservas y licores, así como en repostería. Las hojas, por su parte, han sido utilizadas por la medicina tradicional para suavizar la piel, como antiinflamatorio (Jara, 2012; Piña, 2011) y analgésico en las vías urinarias (Rubilar, 2006). Cabe destacar que esta especie presenta una gran variedad genotípica (Jara, 2012; Seguel y cols., 2000), que repercute sobre su composición química, independiente de las condiciones de cultivo de la planta.

Se han comprobado un gran número de efectos farmacológicos de extractos foliares de murta: actividad analgésica y antiinflamatoria (Aguirre y cols., 2006; Delporte y cols., 2007; Goity, 2013), capacidad antioxidante (Avello & Pastene, 2005; Goity, 2013; Piña, 2011; Rubilar y cols., 2006; Suwalsky 2007), actividad antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Avello y cols., 2009), actividad inhibitoria sobre diversas enzimas reguladoras de la glicemia, como la glicógeno fosforilasa A (Goity, 2013; Peña, 2011; Queupil, 2011; Rubilar y cols., 2011), además de su posible aplicación en la industria cosmética y alimenticia (Hauser y cols., 2014). Asimismo, el extracto etanólico de frutos de murta demostró buena capacidad antioxidante y antibacteriana (Junqueira-Gonçalves y cols., 2015). Estas propiedades son atribuidas a la presencia de triterpenos pentacíclicos (Figura 1) (Goity, 2013) y compuestos fenólicos como flavonoides (Figura 2) (Kim y cols., 2004). Los triterpenoides identificados en las hojas de murtillo también se han descrito en extractos bioactivos de otras especies con propiedades medicinales como *Centella asiatica* (Rumalla y cols., 2010), cuyos efectos antiinflamatorios han sido atribuidos de igual manera a este tipo de triterpenoides.

El mecanismo de acción de los triterpenoides presentes en las hojas de murtillo involucraría acción sobre diversos mediadores: la disminución en la activación de NFκB, la inhibición de la expresión o actividad de gran variedad de enzimas como PLA<sub>2</sub>, 5-LOX, COX-2, elastasas, MMP-9, e inhibición de la actividad del complemento. Además, de la

inhibición de la liberación de histamina por mastocitos, entre otros (Bernard y cols., 2001; Cichewicz y Kouzi, 2004; Liu, 2005; Thuong y cols., 2006) (Tabla 1).

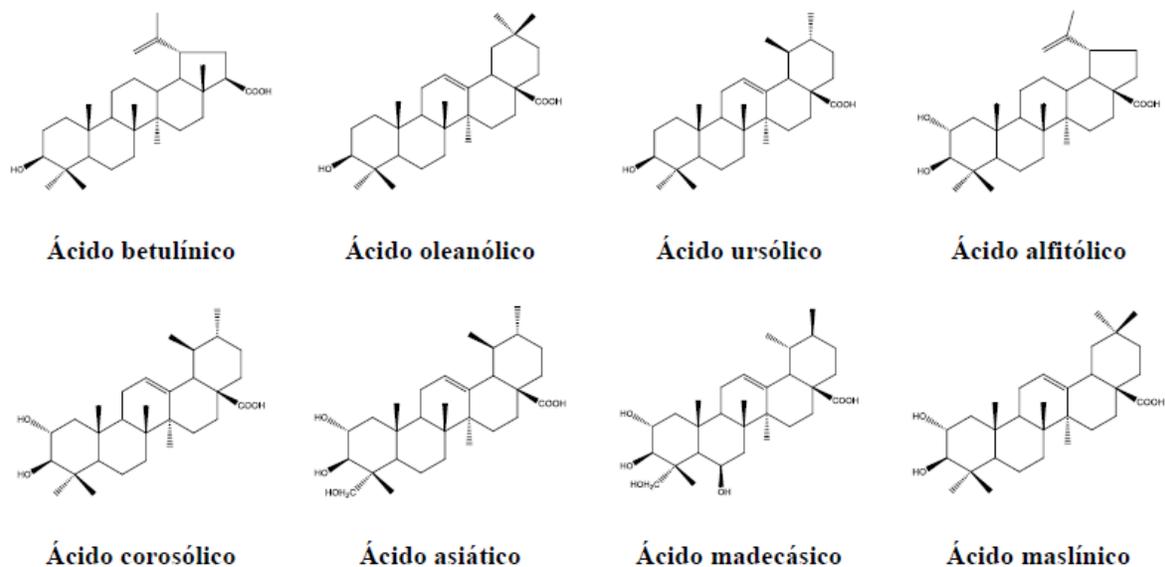
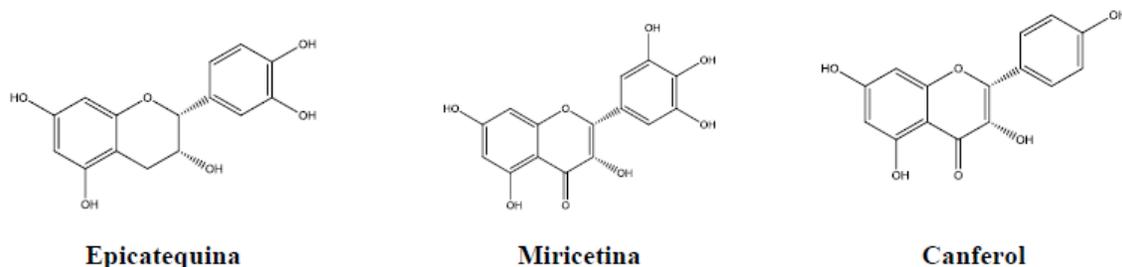


Figura 1: triterpenoides pentacíclicos identificados en las hojas de *Ugni molinae*.

	Ácido betulínico	Ácido oleanólico	Ácido ursólico	Ácido corosólico	Ácido asiático	Ácido madecásico	Ácido maslínico
↓ producción NO (a partir de iNOS)	√		√		√	√	√
↓ expresión COX-2	√		√		√	√	√
↓ activación COX-2		√					
↓ producción de citoquinas proinflamatorias	√				√	√	√
↓ efecto LPS <i>in vivo</i>	√			√			
Prevención traslocación nuclear NFκB	√				√	√	√
↓ activación NFκB		√		√			
Otros efectos			↓5-LOX, 12-LOX, 15-LOX	↓ proteína C reactiva	↓ edema		
Referencias	Planchard y cols., 2012.	Kim y cols., 2012. Cho y cols., 2009.	Wilkinson y cols., 2011. Heu y cols., 2002; Chung y cols., 2001.	Barro y cols., 2004. Yamaguchi y cols., 2006. Chen y cols., 2012.	Patil y cols., 2010. Xu y cols., 2012. Nasir y cols., 2012.	Won y cols., 2010.	Huang y cols., 2011.

Tabla 1: Triterpenoides pentacíclicos descritos en *Ugni molinae* con propiedades antiinflamatorias.

En cuanto a los flavonoides descritos para las hojas de murtila, se encuentran geninas, glucósidos, xilósidos y ramnósidos de quercetina, miricetina y canferol, así como epicatequina y ácido gálico (en extractos acuosos, etanólicos y metanólicos). Estos compuestos fenólicos se comportan como antioxidantes, lo que junto con su capacidad de inhibir enzimas como PLA<sub>2</sub>, 5-LOX y COX-2 y de regular la expresión de esta última e iNOS (Harborne y Williams, 2000; Kim y cols., 2004), potencian la capacidad antiinflamatoria.



**Figura 2: principales compuestos polifenólicos identificados en las hojas de *Ugni molinae***

En esta memoria de título se evaluó el efecto de dos extractos obtenidos de hojas de dos genotipos de *Ugni molinae*, ambos seleccionados por la calidad de sus frutos (extracto etanólico del genotipo 22-1 EET22-1 y extracto de acetato de etilo del genotipo 23-2 EAE23-2), sobre la activación de la sub unidad p65 de NFκB, los niveles proteicos de COX-2, IL-1β, VCAM-1, actividad de iNOS y metaloproteínasa -9 (MMP-9) en fibroblastos cardiacos de rata neonata. Estos genotipos extraídos en los respectivos solventes fueron elegidos por sobre los extractos de otros genotipos por los resultados obtenidos en pruebas de efecto antiinflamatorio y capacidad antioxidante, realizadas previamente en el laboratorio.

Si bien el modelo celular de fibroblastos cardiacos de rata neonata se ha utilizado en nuestro laboratorio para estudiar fibrosis y procesos inflamatorios (Copaja y cols., 2012), existen pocos estudios con productos naturales en fibroblastos (Lombardo y cols., 2015) y ninguno en fibroblastos cardiacos de rata. Con este trabajo se busca observar el comportamiento de este modelo celular bajo las condiciones planteadas, y aumentar el valor agregado de este cultivo de gran apreciación, tanto para el comercio a nivel internacional como para la agricultura familiar campesina (Aguila & Nahuelhual, 2008).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se estudió el contenido de fenoles y de triterpenoides de los EET22-1 y EAE23-2 (Tablas 2 y 3) y su capacidad antioxidante, y también se demostró que presentan un significativo efecto antiinflamatorio por vía oral *in vivo*. Cabe destacar que una fracción rica en triterpenos de un extracto de murta obtenido de un espécimen silvestre recolectado en la provincia de Cauquenes inhibió significativamente la actividad de NF-κB, resultando en una considerable actividad antiinflamatoria tópica (Goity, 2013).

**Tabla 2: Perfil de los triterpenoides encontrados en las hojas de *Ugni molinae* en los genotipos seleccionados.**

Extracto-Genotipo	Ácido madecásico	Ácido asiático	Ácido alfitólico*	Ácido corosólico**	Ácido maslínico	Ácido betulínico	Ácido ursólico y oleanólico
EET 22-1	ND	1,2 ± 0,1	ND	0,6 ± 0,0	2,2 ± 0,1	ND	ND
EAE 23-2	0,5 ± 0,0	9,2 ± 0,8	3,7 ± 0,3	10,1 ± 0,7	16,7 ± 1,2	ND	15,7 ± 0,6

Concentración de triterpenoides (% p/p de extracto seco). (\*) Concentración expresada en ácido betulínico, (\*\*) concentración expresada en ácido ursólico. ND: no detectable.

**Tabla 3: Fenoles totales encontrados en las hojas de *Ugni molinae* en los genotipos seleccionados.**

Extracto – Genotipo	Fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto seco ± DE).
EET 22-1	222,5 ± 4,1
EAE 23-2	57,1 ± 0,6

DE: desviación estándar.

## **2. HIPÓTESIS**

Los extractos etanólicos y de acetato de etilo de hojas de dos genotipos de *Ugni molinae* (EET22-1 y EAE23-2, respectivamente) presentan actividad antiinflamatoria por disminución de mediadores inflamatorios dependientes de NFκB, en fibroblastos cardiacos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad antiinflamatoria de los EET22-1 y EAE23-2 de hojas de murtila en cultivo celular de fibroblastos cardiacos (FC) de rata neonata.

### **3.2. Objetivos específicos**

a) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de los EET22-1 y EAE23-2 sobre la viabilidad celular en FC.

b) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de los EET22-1 y EAE23-2 sobre la activación de NFκB, y los niveles proteicos de IL-1β, COX-2 y VCAM-1 en FC estimulados con LPS.

c) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de los extractos de *Ugni molinae* sobre la actividad de MMP-9 y óxido nítrico sintasa en FC estimulados con LPS.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Reactivos y material de cultivo celular

- Bio-Rad®: EDTA sal disódica, azul de bromofenol, gelatina.
  - Biological Industries: Solución de luminol EZ-ECL solution A, solución de peróxido de hidrógeno estabilizada EZ-ECL solution B.
  - Calbiochem®: IgG anti-ratón conjugada a peroxidasa producida en cabra (402335), IgG anti-conejo conjugada a peroxidasa producida en cabra (401315).
  - Cell Signaling®: Anti-GAPDH monoclonal producido en conejo (12C10), anti-Phospho-NF-κB p65 producido en conejo, anti-NF-κB p65 producido en conejo (D12E12).
  - Gibco®: colagenasa tipo II, medio DMEM/F-12 en polvo (12500-062), suero fetal bovino (FBS; 10500-064), Tripsina/EDTA 10X.
  - Life Technologies®: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; M6494).
  - Merck Millipore®: Anti-COX-2 producido en conejo (ab5118), anti-IL-1β producido en conejo (ab1831p), piruvato de sodio, tritón X-100, HCl fumante 37%, isopropanol, metanol, ácido tricloracético, azul de tripán, ácido acético glacial, azul de Coomassie.
  - Roche Diagnostics: Cocktail inhibidor de proteasas en tabletas Complete Mini (11836153001), cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP en tabletas (04906845001).
  - Santa Cruz Biotechnology: Anti-VCAM-1 monoclonal producido en ratón (MR106).
  - Sigma®: Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS; 0127:B8), reactivo de Griess (G4410-10G), reactivo de Bradford, medio Hank's, medio DME y medio M199, pancreatina, (D)-(+)-Glucosa, Ponceau S.
  - Estándar de peso molecular PageRuler™ de 10 a 180 kDa (Thermo Scientific®: 26616).
  - Membranas de nitrocelulosa proteablot NCP tamaño de poro 0,45 μm (Macherey-Nagel®).
- Leche descremada comercial.
- Winkler: NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, HEPES ácido libre, dimetilsulfóxido (DMSO), Albúmina de suero bovino (BSA, BM-0150), Tris base, Ácido deoxicólico, dodecilsulfato de sodio, glicerol, 2-mercaptoetanol, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, tetrametil etilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (APS), ácido sulfosalicílico, tween 20.

- Placas de cultivo 35 x 10 mm estériles, frascos de cultivo 50 mL estériles, placas de cultivo 100 x 20 mm estériles, por Falcon®. Jeringas 50 mL sin aguja (Nipro), filtros de nitrocelulosa estériles 0,22  $\mu\text{m}$  (Whatman). Material quirúrgico estéril necesario.
- Cámara de Neubauer 0,1 mm de profundidad 0,0025  $\text{mm}^2$  (Hirschmann EM Technicolor).

#### 4.1.2. Soluciones

- Amortiguador de lisis RIPA stock: 4,4 g NaCl, 0,65 g tris base, agua destilada csp 400 mL (hasta llevar a pH 7,2), 5 g ácido deoxicólico, 8,9 g EDTA, 0,5 g SDS, 5 mL tritón X-100, completando el volumen con agua destilada hasta los 500 mL.
- Amortiguador de transferencia 10X: 30,25 g tris base, 144 g glicina, agua destilada csp 1L.
- Amortiguador de carga para electroforesis 4X: 20 mL glicerol, 10 mL 2-mercaptoetanol, 5 g SDS, 1,51 g tris base, 0,01 g azul de bromofenol, agua destilada csp 100 mL.
- Amortiguador de carga para electroforesis de zimografía 4X: corresponde a la misma preparación mencionada anteriormente, sin 2-mercaptoetanol.
- Solución de incubación de zimografía: 5 mL NaCl 2M, 4 mL Tris-HCl pH 8 5M y 0,5 mL  $\text{CaCl}_2$  250mM, agua destilada csp 100 mL.
- TBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCL, 30 g tris base, agua destilada csp 1L, llevando a pH 7,4 con HCl 6N.
- Solución de deshibridación 10X: 2 g rojo Ponceau, 30 g ácido tricloracético, 30 g ácido sulfosalicílico, agua destilada csp 100 mL.
- Solución teñidora: 25 mL isopropanol, 10 mL ácido tricloracético 10%, 0,1 g azul de Coomasie, agua destilada csp 100 mL.
- Solución de medio DMEM/F12 suplementado: al medio DMEM/F12 en polvo disuelto en 1 litro de agua destilada estéril se agregan 1,2 g de  $\text{NaHCO}_3$  y se lleva la solución a pH 7,4. Posteriormente se pasa la solución por un filtro de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Solución PBS (amortiguador utilizado en lavado de placas y preparación de otras soluciones): NaCl 1,3 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  30 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  70 mM, en agua destilada. Se lleva luego la solución a pH 7,4 y se filtra en filtro de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 4.1.3 Equipamiento mayor y menor

- Sala de cultivo equipada con baños termorregulados e instrumentaria básica para realizar los procesos quirúrgicos correspondientes y asegurar la asepsia del trabajo en cultivo celular, como dispensadores de etanol, guantes, etc.
- Campana de flujo laminar de clase II NUAIRE modelo UN 425 400E.
- Incubadora de células con sistema de inyección de CO<sub>2</sub> NUAIRE modelo IR AUTOFLOW.
- Microscopio Zeiss modelo Axiovert 100.
- Equipamiento para montaje de geles de electroforesis y electrotransferencia, por Bio-Rad®: Armazón para geles Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module con juntas, vidrios de 1,5 mm y peinetas incluidas, cámara para electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra cell para 4 geles con electrodos incluidos, vidrios falsos Mini Cell Buffer Dams, Fuente de poder PowerPac™ HC High-Current Power Supply, sistema modular para transferencia húmeda Mini Trans-Blot Module con 2 cassettes para el montaje de geles, esponjas, papel filtro y electrodos.
- Sistema de revelado de geles Syngene modelo G:BOX Chemi XT4, con el software GeneSys incluido.
- Equipo multilector de placas de 96 pocillos Promega modelo Gliomax MULTI.
- Equipo multilector de placas de 96 pocillos Multiskan GO 3.02.
- Incubadora Labnet Mini Incubator.
- Mezclador de suspensión para la agitación de membranas a 4°C (Digisystem Inc)
- Agitador Digital Rotator (Already Enterprise).
- Centrífuga refrigerada (Hettich modelo Mikro 22R).
- pHmetro (JENCO modelo VisionPlus Ph6175).
- Agitador magnético (Heidolph modelo MR3002).
- Transiluminador.
- 

### 4.1.4. Animales

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley de 2-3 días, obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Todos los estudios realizados en animales contaron con la aprobación del Comité de Ética Institucional y se realizaron según la "Guide for the care and use of laboratory animals", del Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH publicación N° 85-23, revisada en 1985).

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Confirmación botánica de la especie vegetal.

La confirmación botánica de la especie fue realizada por la Dra. Carla Delporte, correspondiendo a especímenes de hojas brillantes, con la epidermis superior de tonos de verde más oscuros que la inferior, dispuestas de manera opuesta, de forma aovada-oblonga de entre 2 y 2,5 cm de longitud. Los frutos correspondieron a bayas redondas y carnosas, rojo oscuro, de agradable aroma (Figura 3). Se guardaron testigos de herbario de ambos genotipos en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la U. de Chile (SQF 22552 para el genotipo 22-1 y SQF 22556 para el genotipo 23-2).

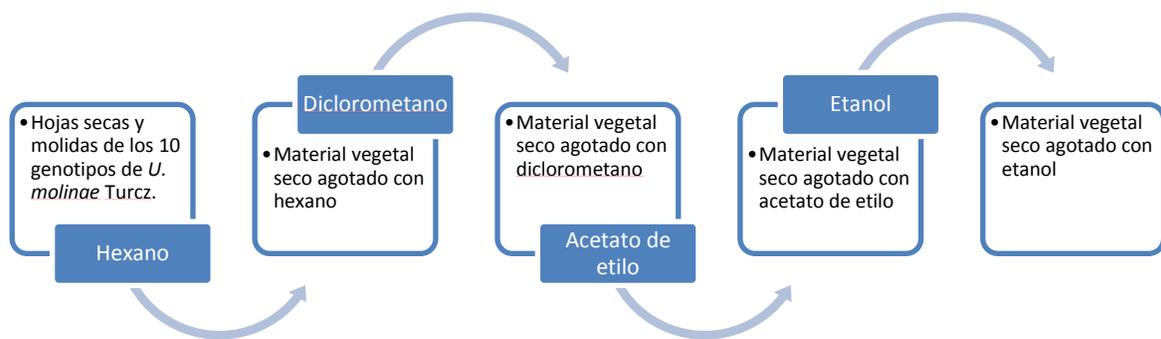


Figura 3: Hojas y frutos de *Ugni molinae* silvestre (Peña, 2011) y hojas secas del genotipo 22-1 de *Ugni molinae*, respectivamente.

El material vegetal fue obtenido del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca, IX Región (Figura 4), y corresponde a 10 genotipos diferentes de *Ugni molinae* cultivados en iguales condiciones edafoclimáticas y sometidas al mismo manejo agronómico, cuya recolección fue realizada en mayo del 2013. Los genotipos fueron seleccionados por la calidad de sus frutos (5 genotipos) y la cantidad de sus hojas (5 genotipos). Las hojas secas y molidas (2,0 kg) fueron sometidas a extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, y los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad eliminando completamente el disolvente (Figura 5). Los rendimientos de los procesos extractivos se detallan en el Anexo 1.



**Figura 4: Cultivos de genotipos de murtila en el INIA de Carillanca, Temuco.**



**Figura 5: Procedimiento de extracción seriada de las hojas de *Ugni molinae*.**

De los extractos mencionados se seleccionaron los correspondientes al extracto etanólico del genotipo 22-1 (EET22-1), proveniente de Mehuín (XV región), y al extracto en acetato de etilo del genotipo 23-2 (EAE23-2), proveniente de Queule (XV Región), ambos seleccionados inicialmente por la calidad de sus frutos. Estos fueron escogidos por su efecto antiinflamatorio (EA) oral en modelo de inflamación inducida por TPA en ratones, evaluado en estudios previos en nuestro laboratorio de productos naturales (Tabla 2). Se caracterizó además el perfil de triterpenoides de ambos extractos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de fotodiodos (CLAE-DAD), y se determinó el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteau (Tablas 2 y 3).

**Tabla 4: Efecto antiinflamatorio por vía oral de los EET22-1, EAE23-2 y de la indometacina en el modelo de inflamación inducido por TPA.**

<b>Extracto – Genotipo/ dosis</b>	<b>%EA ± SEM</b>
EET22-1/ 200 mg/kg	35,3 ± 3,5
EAE23-2/200 mg/kg	28,4 ± 3,0
Indometacina/20 mg/kg	+63,2%

Fármaco de referencia: Indometacina; + efecto máximo.

#### **4.2.2. Cultivo celular.**

##### **4.2.2.1. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos ventriculares de rata neonata.**

Las ratas neonatas se sacrificaron por decapitación, extrayendo de forma inmediata el corazón, bajo condiciones de esterilidad. Los corazones aislados fueron lavados en medio Hank's estéril, y fueron removidas las aurículas y trozados los ventrículos con cuchilla sobre una placa de Petri. Posteriormente se traspasaron los ventrículos trozados a frascos de cultivo de 50 mL y se sometieron a digestiones sucesivas con colagenasa tipo II (0,1 mg/mL) y pancreatina (0,6 mg/mL) en medio Hank's. El producto de digestión fue centrifugado a 12000 g por 10 minutos, y el sobrenadante, rico en fibroblastos, se cultivó en DME/M199 4:1 con 10% FBS y se incubó por 5 días a 37°C. Al día 6 se cambió el medio a DMEM/F12 con 10% FBS y se incubó hasta confluencia. Posteriormente, se tripsinizaron las células y se procedió al conteo de las mismas con azul de Tripán, para sembrar la cantidad deseada para cada estímulo.

Se utilizaron placas de 35 mm, con aproximadamente  $2 \times 10^5$  células cada una y 1 mL de medio DMEM/F12 suplementado sin suero, incubadas por al menos 3 horas para permitir la adherencia y estabilización de las células. Previo a los estímulos, se retiró el medio de cultivo por aspiración con vacío, se lavó cada placa con PBS estéril y se agregó 1 mL de medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS.

##### **4.2.3. Protocolo de estímulos**

- a) Grupo sin tratamiento (ST): células cultivadas sin ningún tratamiento adicional.
- b) Control positivo (LPS): cultivo con 1  $\mu$ L/mL de LPS adicionado.

- c) Grupo con extracto de murtila (E): evalúa el efecto del extracto por sí solo, a la misma concentración utilizada en los grupos siguientes.
- d) Grupo Extracto-LPS (EL): pre incubación con extracto de murtila, y adición de 1  $\mu$ L de LPS 30 minutos después.
- e) Grupo LPS-Extracto (LE): pre incubación con 1  $\mu$ L de LPS, y adición de extracto de murtila 30 minutos después.

#### **4.2.4. Ensayo de viabilidad celular**

Las células fueron estimuladas con las distintas diluciones de extracto por 24 horas, luego se retiró el medio de cada placa por aspiración, se lavó con PBS estéril y se adicionó a cada placa 800  $\mu$ L una solución de MTT 0,5 mg/mL en medio DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS. Luego de 2 horas de incubación se retiró esta solución para solubilizar el formazán remanente con 1 mL de isopropanol. Se llevó 150  $\mu$ L de esta solución a una placa de 96 pocillos, y se leyó la absorbancia a 560 nm.

#### **4.2.5. Western blot**

##### **4.2.5.1. Preparación de extracto proteico**

Luego de las 24 horas de estímulo se sacaron las placas del incubador y se llevaron a hielo. Se retiró el medio de cultivo, almacenándose en tubos eppendorf para ensayos posteriores, y se lavó cada placa con PBS frío, retirando la mayor cantidad de líquido posible. Se añadió a cada placa 60  $\mu$ L de una mezcla de amortiguador de lisis (RIPA 1X) e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las placas se mantuvieron a 4°C por al menos 1 hora, o a -20°C por no más de 3 días, luego de lo cual se rasparon con un rastrillo para células.

##### **4.2.5.2. Preparación de muestras**

El material obtenido luego del raspado se recuperó en tubos Eppendorf y se sonicó (5 minutos, potencia 8), y luego se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se cuantificaron las proteínas del sobrenadante por el método Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Se diluyeron las muestras según la cuantificación y se agregó amortiguador de carga de electroforesis 1X. Las muestras se hirvieron por 5 minutos y luego se almacenaron a -20°C.

#### 4.2.5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Se prepararon las soluciones para el gel separador y concentrador según la tabla 3. Se vertió la solución para el gel separador en el espacio entre los vidrios de 1,5 mm montados, cubriéndola posteriormente con una capa delgada de isopropanol hasta gelificación. Se enjuagaron los geles con agua destilada una vez removido el isopropanol y se adicionó el gel concentrador, ubicando las peinetas con la cantidad deseada de pocillos. Una vez gelificado el gel separador, se procedió a cargar las muestras y el estándar de peso molecular. Se llenó el espacio de los electrodos con amortiguador de electroforesis 1X para dar inicio a la electroforesis.

**Tabla 5: composición del gel separador y concentrador, respectivamente, para producir 2 geles para Western blot.**

	<b>Gel separador (10%)</b>	<b>Gel concentrador (5%)</b>
Acrilamida30%/Bisacrilamida 0,8%)	5,0 mL	1,0 mL
Amortiguador inferior/superior	3,8 mL	-
Amortiguador superior	-	2,5 mL
H <sub>2</sub> O	6,2 mL	6,4 mL
TEMED	8 µL	10 µL
APS 10%	68 µL	90 µL

#### 4.2.5.4. Electrotransferencia

Se realizó una transferencia húmeda con amortiguador de transferencia 1X de los geles resultantes de la electroforesis a membranas de nitrocelulosa, los que se dispusieron enfrentados en cassettes de transferencia. La transferencia de proteínas se realizó según “mA \* t = 600, donde mA” son los mili amperes y t corresponde al tiempo en horas. Una vez terminada la transferencia, se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con una solución al 3% de leche descremada en polvo en TBS-Tween 0,1%, en agitación suave y por 1 hora a temperatura ambiente.

#### 4.2.5.5. Incubación con anticuerpos

Las membranas de nitrocelulosa ya bloqueadas se lavaron por cinco minutos con TBS-Tween 0,1% antes de ser incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4), diluido en leche 3%. La incubación se realizó con agitación constante y a 4°C por al menos 12 horas, luego de las cuales se recuperó el anticuerpo utilizado y se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween 0,1%. El anticuerpo secundario

correspondiente a cada anticuerpo primario se incubó por 1 hora con agitación y a temperatura ambiente, y se lavó cada membrana antes de proceder a la inmunodetección.

**Tabla 6: Anticuerpos primarios y secundarios y la dilución utilizada.**

<b>Anticuerpos primarios (dilución)</b>	<b>Anticuerpos secundarios (dilución)</b>
Anti p-p65 de NFκB (1:1000)	Anti conejo (1:5000)
Anti p65 de NFκB (1:1000)	Anti conejo (1:5000)
Anti IL-1β (1:5000)	Anti conejo (1:5000)
Anti COX-2 (1:1000)	Anti conejo (1:5000)
Anti VCAM-1 (1:1000)	Anti ratón (1:5000)
Anti GAPDH (1:10000)	Anti conejo (1:5000)

#### **4.2.5.6. Inmunodetección**

Se realizó mediante captura fotográfica en el transiluminador Syngene XT4, con ECL A y B como sustratos. Se utilizó el programa Genesys®, acoplado al equipo. Las fotografías se guardaron tanto en positivo como negativo.

#### **4.2.5.7. Análisis densitométrico**

Se analizaron las fotografías tomadas con el software UN-SCAN-IT gel 6.1, cuantificando los pixeles de las fotografías en positivo de las bandas correspondientes para el peso molecular reportado en la literatura. Cada valor se dividió por los pixeles del control de carga correspondiente (GAPDH, salvo p65).

#### **4.2.5.8. Deshibridación de membranas**

Luego de la inmunodetección de un anticuerpo se procedió a deshibridizar las membranas con una solución de rojo Ponceau 1X durante 1 hora, luego de la cual las membranas se lavaron con TBS-Tween 0,1% hasta eliminar por completo la coloración de rojo Ponceau. Una vez deshibridizadas, las membranas se bloquearon con leche y se repitió el proceso descrito en 4.2.4.5. para otro anticuerpo primario.

## 4.2.6. Zimografía

### 4.2.6.1. Preparación de muestras para zimografía

Se preparó amortiguador de carga para electroforesis de zimografía 1X a partir del mismo amortiguador 4X y amortiguador superior. Se diluyó el sobrenadante mencionado en el ítem 4.2.5.1. en amortiguador de electroforesis 1X en proporción 10:90. Estas muestras se prepararon al momento del uso.

Se realizó el procedimiento explicado en el ítem 4.2.4.3., variando la composición de los geles a preparar (Tabla 5) y el grosor de los vidrios utilizados (0,75 mm).

**Tabla 7: composición del gel separador y concentrador para realizar 2 geles para zimografía.**

	<b>Gel separador</b>	<b>Gel concentrador</b>
A/BA	2,5 mL	0,5 mL
Amortiguador inferior	2,6 mL	-
Amortiguador superior	-	0,38 mL
H <sub>2</sub> O	3,79 mL	2,13 mL
Gelatina 10 mg/mL	1 mL	-
TEMED	10 µL	2 µL
APS 10%	100 µL	30 µL

### 4.2.6.2. Incubación de geles y tratamientos posteriores.

Una vez finalizada la electroforesis los geles se incubaron en tritón X-100 al 2,5% por 30 min, para después remover el exceso con agua destilada e incubar los geles en solución de incubación a 37°C, por entre 20 a 24 horas. Terminado el tiempo de incubación se eliminó la solución y se tiñeron los geles con solución teñidora por 1 día, y destiñeron con solución de ácido acético 10%.

### 4.2.6.3. Detección y análisis densitométrico

Se fotografiaron los geles sobre un transiluminador, cuantificando las bandas como negativos tal como se explicó en el ítem 4.2.4.7. El valor de los píxeles obtenidos de la banda correspondiente a MMP-9 se dividieron por los píxeles de MMP-2.

## 4.2.7. Cuantificación de producción de nitrito por reacción de Griess.

Se agregaron 100 µL del sobrenadante mencionado en 4.1.4.1. a una placa de 96 pocillos, y se adicionaron 100 µL de reactivo de Griess, teniendo cuidado de que la placa no recibiera luz directa.

Se midió la absorbancia a los 15 minutos, a 540 nm (Pokharel y cols., 2006). Se realizó además una curva de calibración con  $\text{NaNO}_2$ , expresándose los resultados como  $\mu\text{moles de nitrito/L}$ .

#### **4.3 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM, de al menos 3 experimentos independientes por condición experimental. Se realizó el análisis con software GraphPad Prism 6. Se utilizó test ANOVA de una vía con post test de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró  $p < 0,05$  para diferencia significativa entre los grupos experimentales.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis morfológico del material vegetal

La murtila es una especie caracterizada por una gran variedad genotípica, que repercute tanto en su composición química como en su fenotipo. En este trabajo se trabajó con dos genotipos distintos, por lo que fue necesaria además de su identificación botánica una breve comparación en cuanto a su morfología.

Se observaron diferencias morfológicas entre el material vegetal de los dos genotipos, tanto en las hojas. (Figura 6) como en los frutos, siendo las más destacables las tonalidades del color y ligeros cambios en el tamaño y forma de las hojas.

A



B



Figura 6: Fotografías de testigos herbarios de *Ugni molinae*, genotipos 22-1 (A) y 23-2 (B).

Los extractos estudiados, tanto en este trabajo como en otros del laboratorio, fueron los etanólicos y de acetato de etilo pues estos fueron los con mayor contenido de triterpenoides pentacíclicos y compuestos polifenólicos.

Ambos extractos se disolvieron sin problemas en DMSO, pero no presentaron una solubilidad óptima al mezclarse con medio de cultivo o PBS. Se optó por disolver los extractos en PBS estéril en lugar de utilizar el medio de cultivo, pues se observó

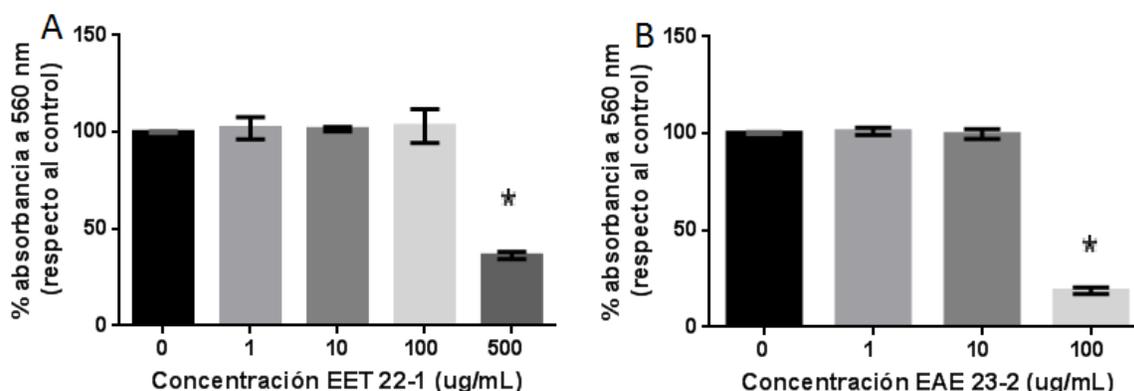
precipitación de material en contacto con el medio de cultivo, lo que hacía poco cuantitativa las diluciones seriadas. Como cabía esperar, la solubilidad del extracto etanólico fue mejor que la del extracto de acetato de etilo.

Se probó la inocuidad de los extractos agregando a cultivos de prueba un 0,1% de DMSO, los cuales no demostraron diferencias con el grupo control. Ningún estímulo superó esta concentración de DMSO.

## 5.2. Viabilidad celular

Para verificar la inocuidad de los extractos fue necesario realizar una prueba de viabilidad celular en conjunto con los extractos, con el fin de determinar la máxima concentración de extracto que no produjera la muerte de más del 80%, emulada a la absorbancia, respecto al control. Para esto se puso a prueba un set de concentraciones fijas mediante el ensayo de MTT, en el cual se determina la capacidad mitocondrial para metabolizar el MTT a formazán, el cual tiene una absorbancia característica.

El extracto EET22-1 demostró no afectar significativamente la viabilidad celular hasta los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 7, A), mientras que el EAE23-2 solo fue inocuo hasta los 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  probados (Figura 7, B). Conforme a estos resultados, los siguientes ensayos se realizaron con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso del EET22-1, y solo con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el EAE23-2.



**Figura 7: Viabilidad celular por ensayo de MTT.** A: Extracto EET 22-1 produce pérdida significativa de viabilidad a los 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a las 24 horas. B: Extracto EAE 23-2 produce pérdida de viabilidad significativa a los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a las 24 horas. Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  respecto al control. Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey ( $n = 4$ ).

### **5.3. Inmunodetección mediante Western blot de mediadores inflamatorios**

#### **5.3.1. Subunidad p65 de NF- $\kappa$ B**

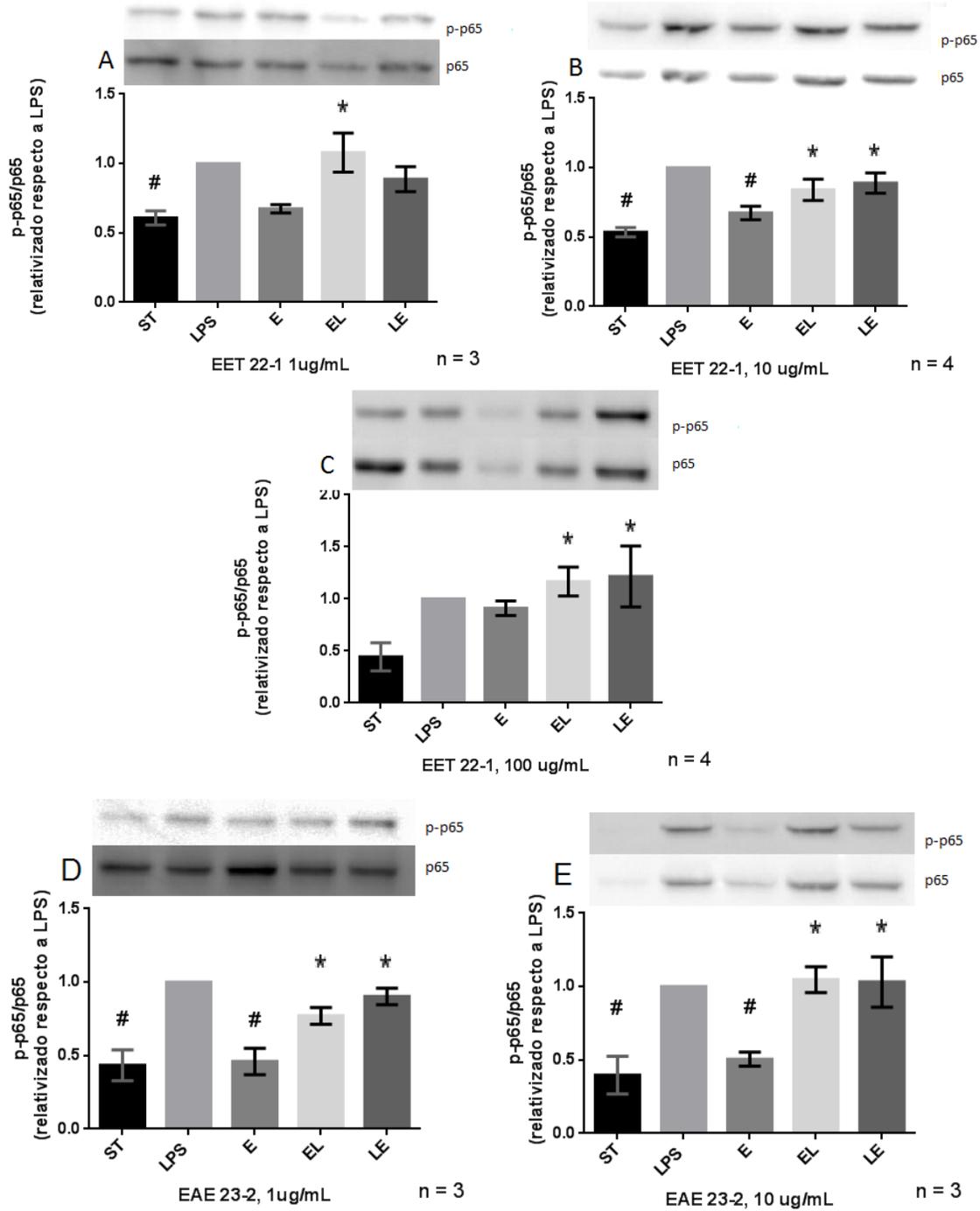
NF- $\kappa$ B es conocido como un factor clave en la regulación de gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios. Este factor es un heterodímero compuesto por las subunidades p65 y p50. Para que NF- $\kappa$ B se active debe fosforilarse para luego traslocarse desde el citosol al núcleo; Se infiere que a mayor fosforilación respecto al total presente, mayor será la activación del factor.

Se cuantificaron la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B fosforilada (p-p65) y la total para determinar el grado de activación de NF- $\kappa$ B luego de 24 horas de haber recibido los estímulos (Figura 8). No se observó una disminución significativa para ninguno de los grupos pre y post tratados (EL y LE) respecto al control LPS, aunque si existe un aumento significativo de estos grupos respecto al grupo sin tratamiento (ST). El extracto (E) por sí solo no provoca un aumento significativo en la fosforilación de p65 en ninguno de los casos, a pesar de observarse una tendencia al aumento a la mayor concentración de EET22-1 (Figura 8 C).

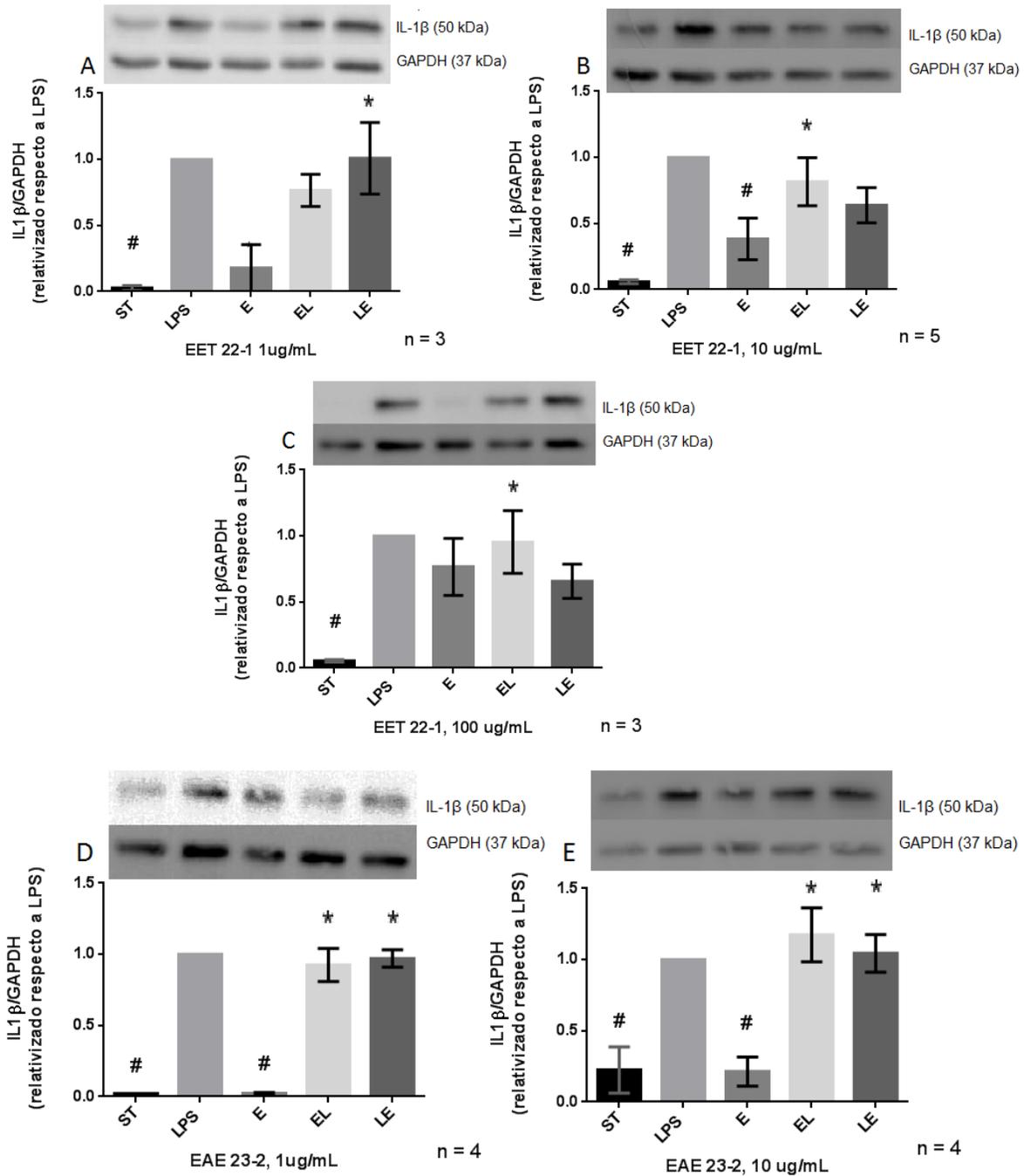
#### **5.3.2. IL-1 $\beta$**

Se midió en nivel proteico de IL-1 $\beta$ , luego de 24 horas de los diferentes estímulos y concentraciones. El objetivo fue cuantificar el aumento o disminución de esta citoquina clave en el inicio y propagación de la cascada inflamatoria. Se graficó la relación entre IL-1 $\beta$  total y el control de carga GAPDH (Figura 9).

No se observó una disminución significativa para ninguno de los grupos pre y post tratados (EL y LE) respecto al control LPS, aunque si existe un aumento significativo de estos grupos con el EAE23-2 y para el grupo pre tratado (EL) en 10 y 100  $\mu$ g/mL de EET22-1, respecto al grupo sin tratamiento (ST); Además hubo una tendencia a la disminución en los grupos post tratados (LE) con estas últimas concentraciones (Figura 9 B y C). El extracto (E) por sí solo mostró una tendencia al aumento solamente para la máxima concentración de EET22-1 (Figura 9 C).



**Figura 8: efecto de los extractos sobre la activación de la subunidad p65 de NFκB.** No se observó significancia respecto al control positivo (LPS 1 μg/mL) tanto en el grupo con pre tratamiento con extracto (EL) como en el grupo tratado luego del LPS (LE), a las 24 horas. Resultados expresados como promedio ± SEM, relativizados respecto a LPS. # p < 0,05 respecto a LPS, \* p < 0,05 respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.



**Figura 9: nivel proteico de IL-1β por efecto de los extractos.** No se observó significancia respecto al control positivo (LPS 1 µg/mL) tanto en el grupo con pre tratamiento con extracto (EL) como en el grupo tratado luego del LPS (LE), a las 24 horas. Resultados expresados como promedio ± SEM, relativizados respecto a control LPS. # p < 0,05 respecto a LPS, \* p < 0,05 respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.

### 5.3.3. COX-2

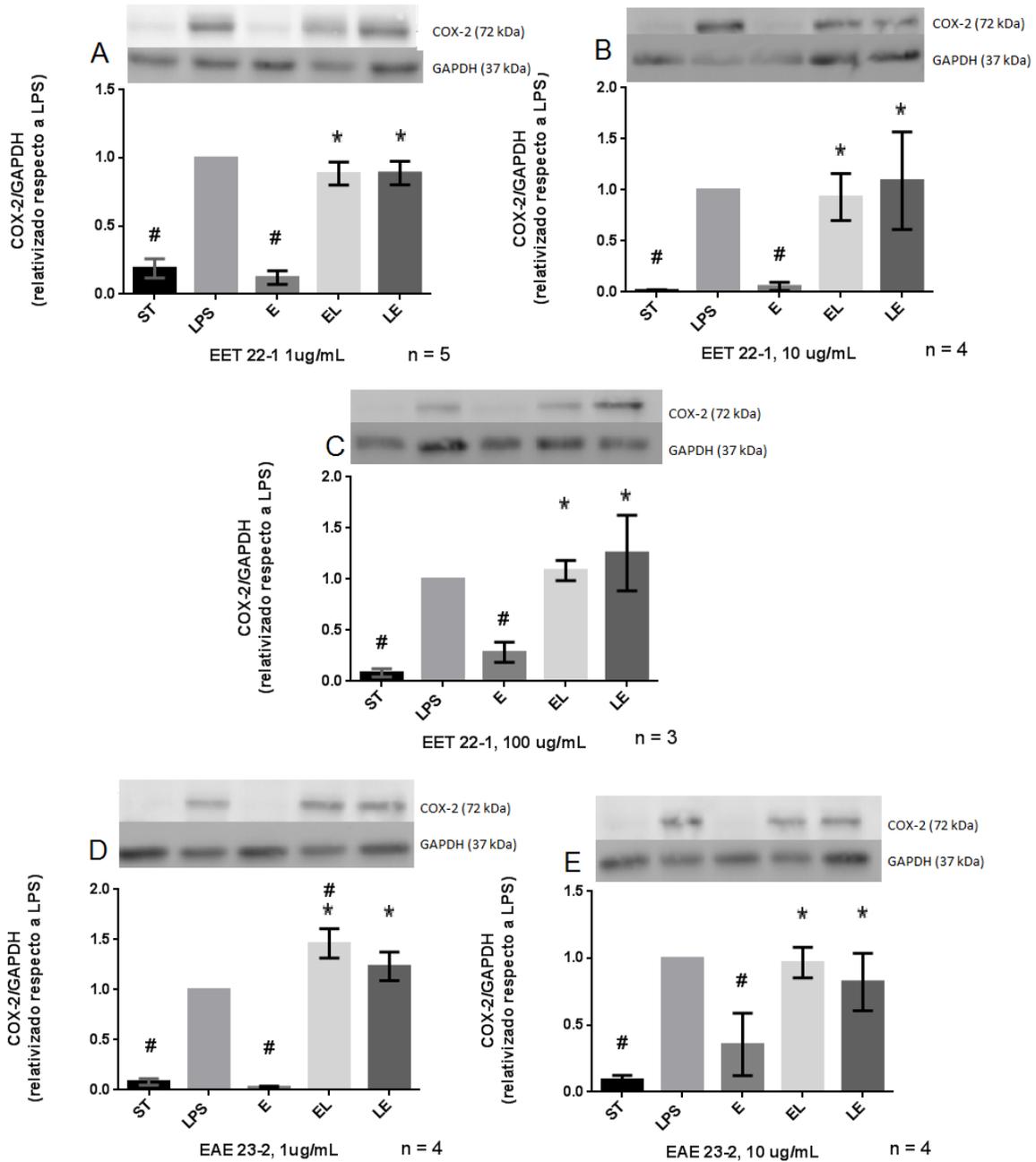
Se midió la cantidad de extracto proteico total de COX-2 luego de 24 horas de los diferentes estímulos y concentraciones, tal de cuantificar el aumento o disminución de esta isoenzima inducible blanco en el tratamiento de la inflamación, responsable del paso limitante en la producción de prostaglandinas. Se graficó la relación entre COX-2 y el control de carga GAPDH (Figura 10).

Al igual que en los ensayos anteriores no se observó una disminución significativa para ninguno de los grupos pre y post tratados (EL y LE) respecto al control LPS, aunque si existe un aumento significativo de estos grupos respecto al grupo sin tratamiento (ST). Cabe destacar que si se observó un aumento significativo del grupo pre tratado (EL) respecto al control LPS para 1 µg/mL de EAE23-2 (Figura 10 D). El extracto solo (E) no mostró aumento en los niveles proteicos de COX-2 a ninguna concentración en ninguno de los estímulos, siendo significativamente menor que el control LPS y estadísticamente igual al grupo sin tratamiento. En cuanto a tendencias, no se observaron similitudes con lo observado con p65 e IL-1β.

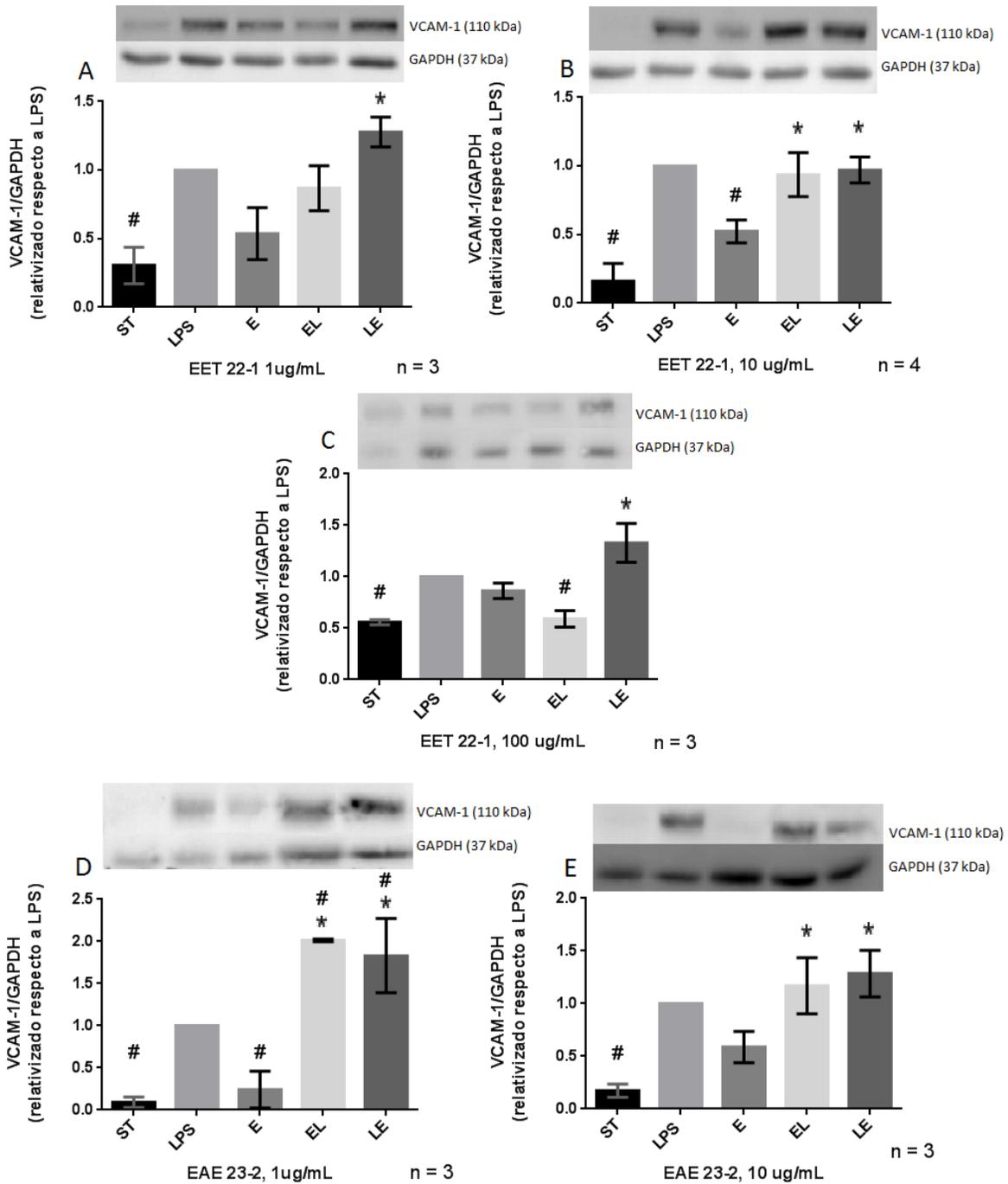
### 5.3.4. VCAM-1

Se midió el nivel proteico de VCAM-1 luego de 24 horas de los diferentes estímulos y concentraciones, tal de cuantificar el aumento o disminución de la proteína de adhesión, que guarda relación con la infiltración de células inmunes al sitio de inflamación. Se graficó la relación entre VCAM-1 y el control de carga GAPDH (Figura 11).

No se observó una disminución significativa para ninguno de los grupos pre y post tratados (EL y LE) respecto al control LPS, salvo en el caso del grupo pre tratado (EL) en la concentración máxima probada de EET22-1. Todos grupos pre y post tratados (EL y LE), a excepción de EL 1 y 100 µg/mL EET22-1 (Figura 11 A y C), mostraron un aumento significativo respecto al grupo sin tratamiento (ST). Así mismo, EL y LE del extracto 1 µg/mL EAE23-2 fueron significativamente superiores tanto al grupo sin tratamiento como al control LPS (Figura 11 D), y 10 µg/mL EAE23-2 fue significativamente mayor respecto al grupo sin tratamiento (Figura 11 E). El extracto solo (E) mostró una tendencia al aumento en 100 µg/mL EET22-1 y en 10 µg/mL EAE23-2, ambas concentraciones máximas probadas de los respectivos extractos (Figura 11 C y E, respectivamente).



**Figura 10: nivel proteico de COX-2 por efecto de los extractos.** No se observó significancia respecto al control positivo (LPS 1 µg/mL) tanto en el grupo con pre tratamiento con extracto (EL) como en el grupo tratado luego del LPS (LE), a las 24 horas, salvo en el caso de EAE23-2 1 µg/mL en que hubo un aumento significativo de la COX-2 en el grupo pre tratado (EL). Resultados expresados como promedio ± SEM, relativizados respecto a control LPS. # p < 0,05 respecto a LPS, \* p < 0,05 respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.



**Figura 11: nivel proteico de VCAM-1 por efecto de los extractos.** No se observó significancia respecto al control positivo (LPS 1 µg/mL) tanto en el grupo con pre tratamiento con extracto (EL) como en el grupo tratado luego del LPS (LE), a las 24 horas, salvo una disminución de VCAM-1 para el grupo pre tratado (EL) de EET22-1 100 µg/mL, y un aumento para el grupo pre y post tratado de EAE23-2 1 µg/mL. Resultados expresados como promedio ± SEM, relativizados respecto a control LPS. # p < 0,05 respecto a LPS, \* p < 0,05 respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.

### **5.5. Cuantificación relativa de la actividad de MMP-9**

Se cuantificó la actividad de MMP-9 presente en el sobrenadante del cultivo celular. La MMP-9 es una enzima degradadora de la matriz extracelular cuya expresión es activada por IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  en FC. Se ha visto que, junto con MMP-2, son fundamentales para la migración celular (Okada y cols, 2013), No se conoce a fondo su rol bajo condiciones patológicas, pero se ha reportado un aumento de su expresión durante el proceso inflamatorio. Se graficó la relación entre MMP-9 y MMP-2 (Figura 12), pues esta última se expresa de forma constitutiva.

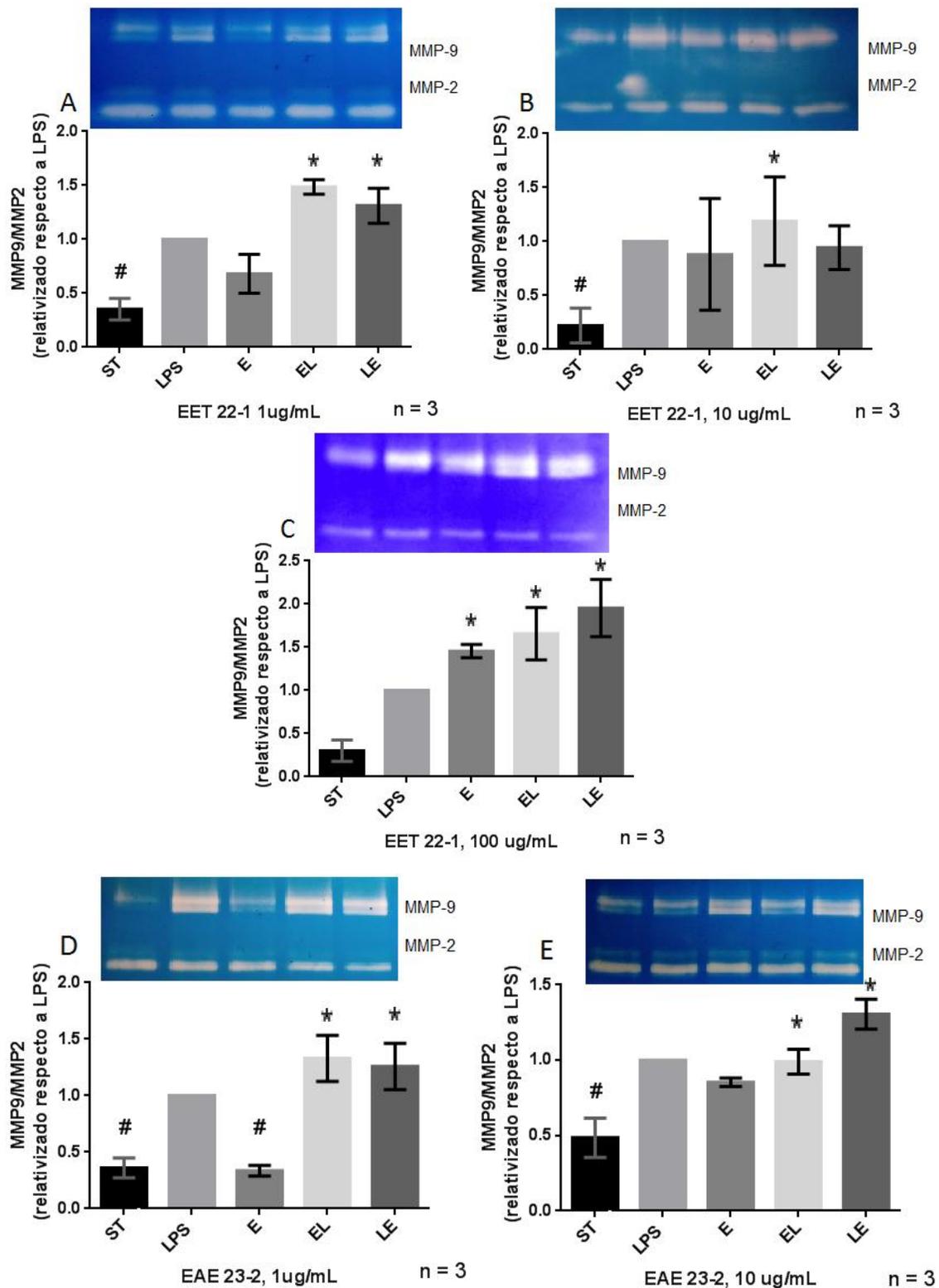
Se observó para los grupos pre y post tratados (EL y LE), en todas las condiciones probadas, un aumento significativo respecto al grupo sin tratamiento (ST), con excepción del grupo post tratado 10  $\mu$ g/mL EET22-1 (Figura 12 B). El extracto solo (E) también aumentó significativamente a 100  $\mu$ g/mL (Figura 12 C), y mostró una tendencia al aumento con 10  $\mu$ g/mL de ambos extractos (Figura 12 B y E).

### **5.4. Cuantificación de la producción de nitrito.**

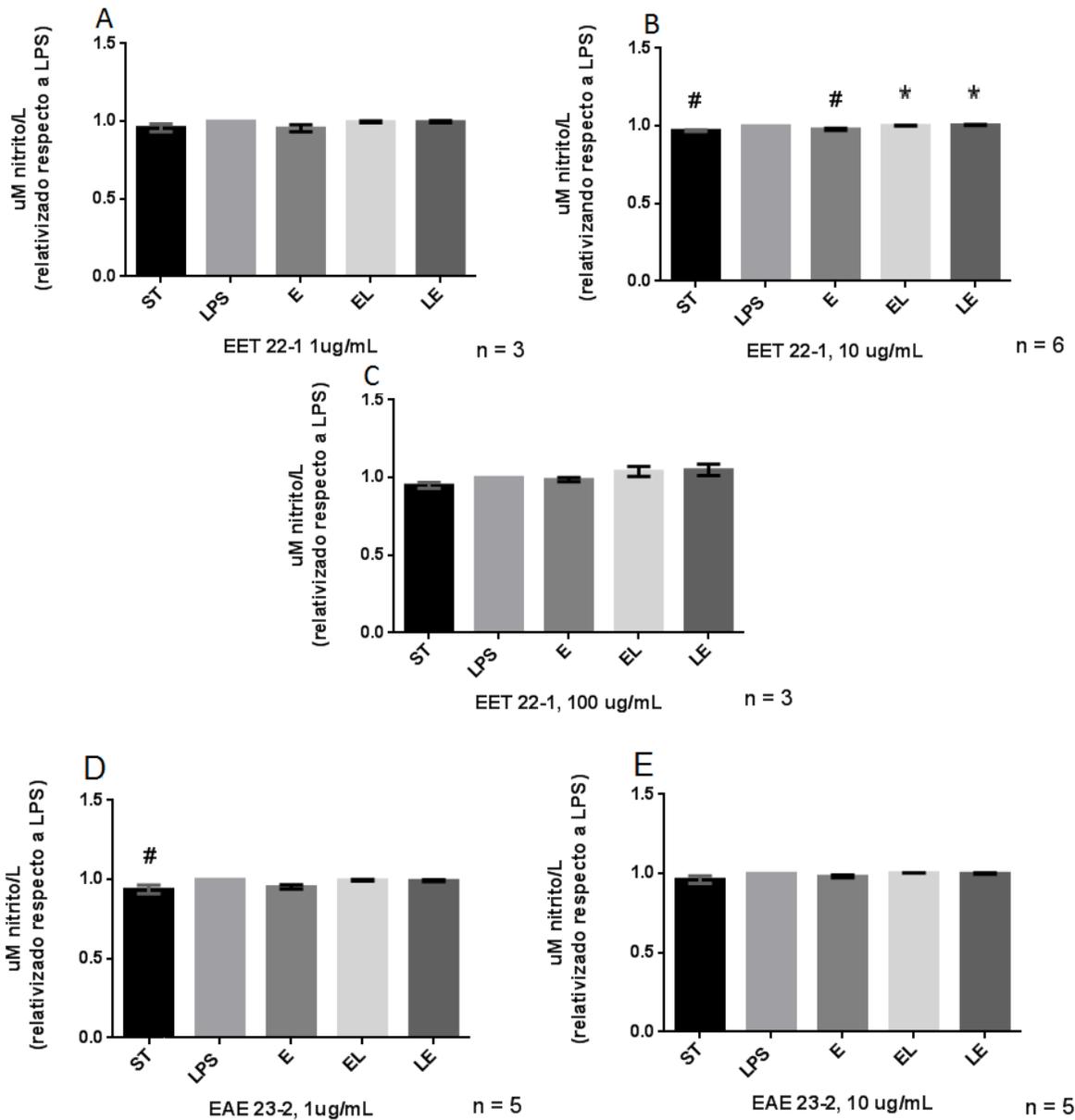
El NO cumple con gran cantidad de funciones biológicas, entre las cuales se encuentra el aumento de la permeabilidad capilar, lo que es de gran importancia para el paso de células inflamatorias al sitio de inflamación. Se ha visto, además, un aumento de la transcripción y actividad de la iNOS con la activación de NF $\kappa$ B. Esta enzima inducible cataliza la producción de NO ante estímulos, por lo que la cuantificación de nitrito, producto de degradación del NO, es una medida indirecta de la actividad de la iNOS.

La cuantificación se realizó según el método de Griess, utilizando además una curva de calibración con nitrito de sodio.

Como se muestra en la figura 13, no se observó una diferencia significativa entre el grupo estimulado con LPS y el grupo sin tratamiento (ST), salvo en el caso de EET 22-1 y EAE 23-2, ambas con 10  $\mu$ g/mL (Figura 13 B y D), lo que es insuficiente para validar los resultados de estos ensayos.



**Figura 13: Efecto de los extractos sobre la actividad de MMP-9.** No se observaron diferencias significativas respecto al grupo control positivo (LPS 1  $\mu$ g/mL) en ninguno de los casos de B, y tampoco en los grupos pre tratados (EL) y tratados (LE) con extracto a 1  $\mu$ g/mL, a las 24 horas. Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM, relativizados respecto a control LPS. #  $p < 0,05$  respecto a LPS, \*  $p < 0,05$  respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.



**Figura 12: efecto de los extractos sobre la concentración de nitritos presentes en el sobrenadante.** Solo se observó significancia en la figura A y D, entre el grupo control positivo (LPS 1 µg/mL) y el grupo control, a las 24 horas. Resultados expresados como promedio ± SEM, relativizados respecto a control LPS. . # p < 0,05 respecto a LPS, \* p < 0,05 respecto a grupo sin tratamiento (ST). Análisis estadístico: ANOVA una vía y post test de Tukey.

## 6. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó una evaluación de distintos parámetros involucrados en el proceso inflamatorio, entre los cuales se incluyeron citoquinas como IL-1 $\beta$ , enzimas inducibles como COX-2, MMP-9 e iNOS (esta última cuantificada de forma indirecta como producción de nitrito), moléculas de adhesión como VCAM-1 y la subunidad p65 del factor transcripcional NF $\kappa$ B. Se seleccionaron estos parámetros intentando abarcar distintos puntos de la cadena inflamatoria para observar los posibles efectos de los extractos. No se estudiaron, sin embargo, citoquinas anti-inflamatorias u otros mediadores relacionados con la etapa de terminación.

Con el ensayo de MTT se realiza una medición indirecta de la viabilidad, ya que se evalúa el funcionamiento mitocondrial y se asume que, si existe integridad en la mitocondria la célula está viva. Para este trabajo se consideró que la técnica era suficiente para el estudio de viabilidad, pero se podría haber complementado con la técnica de azul de Tripán, que es cuantitativa. Se observó pérdida de viabilidad a menores concentraciones con el EAE23-2 en comparación con EET22-1, pudiendo atribuirse tanto a los mayores niveles de triterpenoides de EAE, cuyas diferencias se observan en la tabla 2, como a las concentraciones mayores de polifenoles en EET, al menos 300% mayores que en EAE23-2, o una combinación de ambos. Los valores observados son similares a los mostrados por Goity en 2013 para un extracto de acetato de etilo de hojas de murtila silvestre a las 24 horas en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 y células 3T3-L1 (fibroblastos embrionarios). En este mismo trabajo se observó una notable pérdida de viabilidad a los 100  $\mu$ M de ácido asiático, ursólico, corosólico, alfitólico y oleanólico en las células 3T3-L1 a las 24 horas, más no en células RAW 264.7 en igualdad de condiciones. Estos resultados apoyarían la propuesta de que el efecto tóxico se debe a la mayor cantidad de triterpenoides. Se ha visto, además, que extractos acuosos de murtila producirían cambios estructurales en glóbulos rojos humanos (Suwalsky y cols, 2006) de forma concentración dependiente. En este trabajo los cambios en la morfología celular fueron atribuidos a los compuestos polifenólicos del extracto, los que podrían haberse incorporado a la membrana celular, modificando su orden, fluidez y funcionalidad, aunque no se descarta el rol de otro tipo de compuestos.

Solo se observó una disminución estadísticamente significativa, respecto al grupo LPS, en el nivel proteico de VCAM-1 en el grupo pre tratado con 100 µg/mL EET22-1, a las 24 horas, por lo que no se puede afirmar que los extractos disminuyeron la activación o niveles proteicos de los mediadores evaluados. Se observó tendencia al aumento en los grupos pre y post tratados, respecto al grupo LPS, especialmente cuando se estimuló con el extracto en acetato de etilo, o con altas concentraciones del extracto etanólico, lo que guardaría cierta relación con lo observado en la prueba de viabilidad. El extracto por sí solo no provocó un aumento en los mediadores medidos, en la mayoría de los casos, asimilándose al grupo sin tratamiento. Con estos resultados se podría inferir que los extractos no provocarían inflamación, salvo a altas concentraciones, pues se observó aumento con 100 µg/mL de EET22-1 para todos los mediadores evaluados, salvo por COX-2.

La zimografía se presenta como un método elegible por sus múltiples ventajas (Vandooren y cols, 2013) ante la medición de expresión, aunque con gran cantidad de etapas y variabilidad al fotografiar el gel. El tiempo de incubación también es un factor importante que tabular según el tipo de muestra. Se pudo observar con claridad pro-MMP-9 y pro-MMP-2, siendo esta última un óptimo control de carga ya que ni el estímulo con LPS (Tomita y cols., 2015) ni los extractos provocaron cambios en su actividad, al ser una enzima constitutiva.

Sobre la actividad de MMP-9, se observó una tendencia al aumento en los grupos con pre y post tratamiento en todas las concentraciones para ambos extractos, respecto al control LPS, a las 24 horas, y se observó además una tendencia al aumento dosis dependiente al tratarse los fibroblastos solamente con el extracto. Por las funciones clásicas de MMP-9 este aumento podría sugerir mecanismos anti fibróticos, al degradar el exceso de MEC que pudo producirse en la reparación tisular (Fan y cols., 2012), aunque es necesario realizar estas experiencias a tiempos largos, 48 o 72 horas, y la medición de otros mediadores, como colágeno, para apoyar esta propuesta.

Respecto a la cuantificación de nitrito, está reportado que LPS aumenta de forma significativa los niveles de nitrito en fibroblastos cardiacos a las 76 horas (Tomita y cols., 2015), por lo que es posible que el tiempo de incubación fuese insuficiente para que la mayoría del NO llegase a nitrito. Se observó en la gran mayoría de los casos falta de

significancia estadística a pesar de observarse ciertas tendencias marcadas. Para definir estas últimas se podría aumentar el número de experimentos por condición, eliminar ciertas condiciones experimentales en cuanto se valide el estudio (mantener solamente el grupo tratado con LPS y los grupos pre y post tratados) y/o cambiar la estadística utilizada, por ejemplo, utilizando post test de Dunnet en lugar de Tukey. Las dos primeras posibilidades fueron desestimadas por falta de tiempo y otros recursos, y no se estimó pertinente el cambio en el post test al ser este menos exigente.

## 7. CONCLUSIONES

Fibroblastos cardiacos pierden 63,8% de viabilidad al usar 500 ug/ml del extracto EET22-1, y 81,2% de viabilidad al usar 100 ug/ml del extracto EAE23-2, a las 24 horas de ensayo.

Tanto el extracto etanolico del genotipo 22-1 como el extracto de acetato de etilo del 23-2 de *Ugni molinae* no disminuyeron de forma significativa los mediadores inflamatorios estudiados en fibroblastos cardiacos de rata neonata, a las 24 horas.

En los parámetros evaluados ambos extractos por sí solos no producen estímulo inflamatorio, pero al encontrarse en conjunto con LPS no logran disminuir la señal inflamatoria de forma significativa, con excepción del pre tratamiento con extracto etanólico a altas concentraciones en VCAM-1.

Se observó una tendencia al aumento en la actividad de MMP-9 en la mayoría de las condiciones estudiadas.

## 8. PROYECCIONES Y LIMITACIONES

Se estima necesario realizar una curva de dosis respuesta más extensa (desde 5 a 150 µg/mL, por ejemplo) para el extracto EET22-1, que resultó más inocuo que el EAE23-2. Además, se estima conveniente realizar estímulos a tiempos cortos, como 6 horas, para observar expresión de los mediadores más relevantes, y a tiempos mayores como 48 o 72 horas, para observar el efecto de las metaloproteinasas y colágeno, y repetir las mediciones de nitrito a tiempos largos.

No se realizó ninguna prueba comparativa con un fármaco de referencia o un inhibidor de NFκB, por lo que también se considera esto como un paso a seguir. De la misma forma, no se midió ningún mediador relacionado con la fase de terminación, y por lo tanto, no sabemos si los extractos podrían mejorar esta fase en lugar de detener la iniciación o propagación, en fibroblastos cardiacos. Tampoco se realizó ninguna prueba sobre la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, evento observado en patologías cardiovasculares.

El modelo celular utilizado es adecuado para observar inflamación, pero teniendo en cuenta los antecedentes en cuanto a poder antiinflamatorio y los resultados obtenidos, sería recomendable realizar estas experiencias en otro tipo de fibroblastos, como los cutáneos, en macrófagos o en células epiteliales.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguila C., Nahuelhual L., Cultivo de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) como alternativa de diversificación productiva para la agricultura familiar campesina de la cordillera de la costa, Agro Sur, 36 (3): 158-167, 2008.

Aguirre M.; Delporte C.; Blackhouse N.; Erazo S.; Letelier M. E.; Cassels B. K.; Silva X.; Alegría S.; Negrete R., Topical anti-inflammatory activity of  $\alpha$ -hidroxi pentacyclic triterpen acids from the leaves of *Ugni molinae*, Bioorganic & Medical Chemistry (14): 5673-5677, Mayo 2006.

Avello M., Pastene E., Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz ("Murtila"), Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2): 33-39, Marzo 2005.

Avello M.; Valdivia R.; Mondaca M.; Ordoñez J.; Bittner M.; Becerra J., Actividad de *Ugni molinae* Turcz frente a microorganismos de importancia clínica, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(2): 141-144, Marzo 2009.

Banno N., Akihisa T., Tokuda H., Yasukawa K., Higashihara H., Ukiya M., Watanabe K., Kimura Y., Hasegawa J., Nishino H., Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory antitumor-promoting effects, Bioscience, biotechnology and biochemistry, 68 (1):85-90, 2004

Bernard, P., Scior, T., Didier, B., Hibert, M., Berthon, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. Phytochemistry, 58(6):865-874, 2001.

Brown D., Ambler K., Mitchell D., Long C., The Cardiac Fibroblast: Therapeutic Target in Myocardial Remodeling and Failure, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45:657-687, 2005.

Chapman K., Coutinho A., Zhang Z., Kipari T., Savill J., Seckl J., Changing glucocorticoid action: 11 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 137: 82-91, 2013.

Chen H., Yang J., Zhang Q., Chen L., Wang Q. Corosolic acid ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by regulating the NF- $\kappa$ B pathway and inhibiting monocyte chemoattractant protein-1 expression, Japanese circulation journal, 76 (4):995-1003, 2012.

Chen W., Frangogiannis N., Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair, Biochimica et Biophysica Acta, 1833:945-053, 2013.

Cho S., Ban J., Kim J., Jeong H., Lee I., Song K., Seong Y., *Aralia cordata* protects against amyloid  $\beta$ -protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured neurons and has antidementia activities in mice, Journal of pharmacological sciences, 111(1):22-32, 2009.

Choi E., Hwang J., Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> and cytokines in RAW 264.7 macrophages, Fitoterapia, 76: 608-613, 2005.

Chung Y., Heo H., Kim E., Kim H., Huh T., Lim Y., Shin D., Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase, Molecules and cells, 11(2):137-143, 2001.

Cichewicz, R.H y Kouzi, S.A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. Med. Res. Rev., 24(1):90-114, 2004.

Copaja M, Venegas D, Aranguiz P, Canales J, Vivar R, Avalos Y, Garcia L, Chiong M, Olmedo I, Catalan M, Leyton L, Lavandero S, Diaz-Araya G., Simvastatin disrupts cytoskeleton and decrease cardiac fibroblast adhesion, migration and viability, Toxicology, 294(1):42-9. 2012.

De Argila C., Aproximación a evidencias a favor de la prescripción de los inhibidores selectivos de la COX-2, Journal of Gastroenterology and Hepatology, 31(2): 34-41, 2008.

Delporte C.; Blackhouse N.; Inostroza V.; Silva X.; Negrete R.; Miranda H. F., Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtila) in mice models of acute pain, Journal of Ethnopharmacology, (122): 162-165, Febrero 2007.

Fan D., Takawale A., Lee J., Kassiri Z., Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease, Fibrogenesis & Tissue Repair, 5:15, 2012.

Goity L., Caracterización de los compuestos activos de *Ugni molinae* (murtilla) y sus potenciales efectos hipoglicemiantes, anti-inflamatorios y antioxidantes. Tesis doctoral, Santiago, Chile. Universidad de Chile, 2013.

Harborne J., Williams C., Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 55:481-504, 2000.

Hauser C.; Peñaloza A.; Rodriguez F.; Guarda A.; Galotto M. J., Promising antimicrobial and antioxidant extracts of Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz): Shelf-life extension and food safety, Food Packing and Shelf Life, 1: 77-85, 2014.

Heo H., Cho H., Hong B., Kim H., Heo T., Kim E., Kim S., Kim C., Shin D., Ursolic acid of *Origanum majorana* L. reduces Abeta-induced oxidative injury, Molecules and Cells, 13:5-11, 2002.

Hseu Y., Wu F., Wu J., Chen J., Chang W., Lu F., Lai Y., Yang H., Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway, International Immunopharmacology, 5; 1914-1925, 2005.

Huang S., Chiu C., Chen H., Hou W., Sheu M., Lin Y., Shie P., Huang G., Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic acid in mice, Evidence-based complementary and alternative medicine: 1-10, 2011.

Jara D., Estudio químico y farmacológico de distintos genotipos de *Ugni molinae* Turcz (murtilla) Myrtaceae, Investigación bibliográfica de aspectos bioéticos en la experimentación en modelos animales. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2012.

Junqueira-Gonçalves M., Yañez L., Morales C., Navarro M., Contreras R., Zuñiga G., Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity, Molecules, 20: 5698-5713, 2015.

Kim S., Kim D., Chae M., Jeong I., Cho J., Choi N., Ryu E., Synthesis and Evaluation of Oleanolic Acid-Conjugated Lactoferrin for  $\beta$ -Amyloid Plaque Imaging. Bulletin of the Korean chemical society, 33(11):3671-3675, 2012.

Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms, Journal of Pharmacological Sciences, 96: 229-245, 2004.

Kim J., Park S., Yun K., Cho Y., Park H., Lee K., Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via de attenuation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages, European Journal of Pharmacology, 584: 175-184, 2008.

Liu J., Liu W., Xie Y., Wang Y., Ouyang X., Adhesion of monocytes to periodontal fibroblasts requires activation of NOD1/2- and TLR4-mediated LFA-1 and VLA-4, Archives of Oral Biology, 60: 834-844, 2015.

Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. Journal of Ethnopharmacology, 100: 92-94, 2005.

Lombardo T., Palomari D., Grenier D., Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial and fibroblasts, Archives of Oral Biology, 60: 845-853, 2015.

Luo H., Tu G., Liu Z., Liu M., Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression, Cancer Letters, 361: 155-163, 2015.

Mehta D, Bhargava DK, Non-steroidal Anti Inflammatory Drugs and Gastrointestinal Toxicity, Apollo Medicine, 7:(4), 252, 2010.

Nasir M., Abdullah J., Habsah M., Ghani R., Rammes G., Inhibitory effect of asiatic acid on acetylcholinesterase, excitatory post synaptic potential and locomotor activity, Phytomedicine, 19(3):311-316, 2012.

Ogata S., Kubota Y., Satoh S., Ito S., Ca<sup>2+</sup> stimulates COX-2 expression through calcium-sensing receptor in fibroblasts, Biochemical and Biophysical Research Communications, 351: 808-814, 2006.

Okada M., Suzuki I., Yamawaki H., Hara Y., Levosimendan inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced cell migration and MMP-9 secretion in rat cardiac fibroblasts, European Journal of Pharmacology, 718(1-3):332-339, 2013.

Pastenes C.; Santa María E.; Infante R.; Franck N., Domestication of the Chilean guava (*Ugni molinae* Turcz), a forest understory shrub, must consider light intensity, Scientia Horticulturae, 98: 71-73, 2003.

Patil S., Maki S., Khedkar S., Rigby A., Chan C., Withanolide A and asiatic acid modulate multiple targets associated with amyloid- $\beta$  precursor protein processing and amyloid- $\beta$  protein clearance, Journal of natural products, 73(7):1196-1202, 2010.

Penna M., Identificación de la sapogenina principal de una fracción de un crudo de sapogeninas de *Quillaja saponaria* Mol. Evaluación de su efecto sobre la expresión de COX-2 en células RAW 264.7. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2012.

Peña M., Determinación de la sapogenina mayoritaria obtenida de las saponinas de hojas de *Ugni molinae*, Turcz. (murtilla) y evaluación de la actividad inhibitoria sobre glicógeno fosforilasa A. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2011.

Piña Y., Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2011.

Planchard M., Samel M., Kumar A., Rangachari V., The Natural Product Betulinic Acid Rapidly Promotes Amyloid- $\beta$  Fibril Formation at the Expense of Soluble Oligomers, ACS chemical neuroscience, 3(11):900-908, 2012.

Pokharel Y., Yang J., Kim J., Oh H., Jeong H., Woo E., Kang K., Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone, Nitric Oxide, 15 (3): 217-225, 2006.

Queupil M. J., Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa A de los extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz (murtilla) Myrtaceae. Identificación de los principios activos. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2011.

Rockey D., Bell D., Hill J., Fibrosis – A Common Pathway to Organ Injury and Failure, The New England Journal of Medicine, 372 (12):1138-1148, 2015.

Rubilar M.; Jara C.; Poo Y.; Acevedo F.; Gutierrez C.; Sineiro J.; Shene C. , Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz): sources of antioxidant compounds and  $\alpha$ -glucosidase/ $\alpha$ -amylase inhibitors, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(1):1630-1637, 2011.

Rubilar M.; Pinelo M.; Ihl M.; Scheuermann E.; Sineiro J.; Nuñez M.J., Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(1):50-64, 2006.

Rumalla, C.S., Ali, Z., Weerasooriya, A.D., Smillie, T.J. y Khan, I.A. Two New Triterpene Glycosides from *Centella asiatica*. Planta Medica, 76 (10):1018-1021, 2010.

Sandanger O., Ranheim T., Vinge L., Bliksoen M., Alfsen K., The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischemia-reperfusion injury, Cardiovascular Research, 99:164-174, 2013.

Sbaizero O., DelFavero G., Martinelli V., Long C. S., Mestroni L., Analysis of long- an short-range contribution to adhesion work in cardiac fibroblasts: An atomic force microscopy study, Materials Science and Engineering C, 49:217-224, 2015.

Seguel, I.; Peñalosa, E.; Gaete, N.; Montenegro, A; Torres, A. Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile, Agro Sur, 28(2):32-41, 2000.

Sung B., Prasad S., Gupta S., Patchva S., Aggarwal B., Regulation of inflammation-mediated chronic diseases by botanicals, Advances in Botanical Research, 62:57-132, 2012.

Suwalsky M.; Orellana P.; Avello M.; Villena F., Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage in human erythrocytes, Food and Chemical Toxicology, 45:130-135, 2007.

Suwalsky M.; Orellana P.; Avello M.; Villena F., Sotomayor C., Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni Molinae* leaves, Food and Chemical Toxicology, 44:1393-1398, 2006.

Thuong, P. T., Jin, W., Lee, J., Seong, R., Lee, Y. M., Seong, Y., Bae, K. Inhibitory effect on TNF- $\alpha$ -induced IL-8 production in the HT29 cell of constituents from the leaf and stem of *Weigela subsessilis*. Archives of pharmacal research, 28(10):1135-1141, 2005.

Tomita K., Takashina M., Mizuno N., Sakata K., Hattori K., Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction, Journal of Surgical Research, 193:874-887, 2015

Tsatsanis C.; Androulidaki A.; Venihaki M.; Margioris A. N., Signaling networks regulating cyclooxygenase-2, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 38 (10):1654-1661, 2006.

Vandooren J., Geurts N., Martens E., Van den Steen P., Opdenakker G., Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes, Nature Methods, 10(3):211-220, 2013.

Wilkinson K., Boyd J., Glicksman M., Moore K., El Khoury J., A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid  $\beta$  protein interactions with its receptor CD36., Journal of Biological Chemistry, 286(40):34914-34922, 2011.

Won J., Shin J., Park H., Jung H., Koh D., Jo B., Lee Y., Yun K., Lee K. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF- $\kappa$ B pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells, Planta Medica, 76 (3):251-257, 2010.

Xu M., Xiong Y., Liu J., Qian J., Zhu L., Gao J., Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells, Acta Pharmacologica Sinica, 33(5):578-587, 2012.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Rendimiento del procedimiento de extracción seriada de las hojas de *Ugni molinae* en los genotipos seleccionados.

Genotipo	Extracto hexánico	Extracto en diclorometano	Extracto en acetato de etilo	Extracto etanólico
22-1	1,1%	1,6%	5,4%	13%
23-2	1,2%	1,3%	7%	12,1%