

Efecto de algunas especies vegetales antiinflamatorias sobre la actividad enzimática de elastasa y mieloperoxidasa

Paola Andrea Cárdenas,¹ Diana Marcela Aragón,¹ Luis Fernando Ospina,¹ Gustavo Isaza,² Jorge Enrique Pérez^{2*}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

² Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas.

* Autor de correspondencia: correo electrónico dmaragonn@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 10 de septiembre de 2012.

Aceptado para publicación: 30 de noviembre de 2012.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de extractos metanólicos y acuosos de las especies vegetales *Critoniella acuminata*, *Salvia rubescens*, *Phenax rugosus* (Poir.) Wedd y *Tabebuia chrysanta* G. Nicholson sobre las enzimas elastasa y mieloperoxidasa, relacionadas con el proceso de desgranulación leucocitaria, y se determinó el potencial efecto inhibitorio directo sobre la enzima o la inhibición de la desgranulación de los neutrófilos polimorfonucleares. Los extractos de *Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* presentaron efectos sobre el proceso de desgranulación y la actividad de las enzimas mieloperoxidasa y elastasa; en el caso de los extractos de *Phenax rugosus*, estos no mostraron un efecto significativo sobre ninguna de las enzimas. De la especie *Tabebuia chrysanta* solamente el extracto metanólico mostró efecto sobre la inhibición de la actividad elastasa.

Palabras clave: *Critoniella acuminata*, desgranulación, elastasa, mieloperoxidasa, *Phenax rugosus*, *Salvia rubescens*, *Tabebuia chrysanta*.

SUMMARY

Effect of some antiinflammatory plant species on elastase and myeloperoxidase enzyme activity

In this work, the effect of aqueous and methanolic extracts of the plants species *Critoniella acuminata*, *Salvia rubescens*, *Phenax rugosus* (Poir.) Wedd and *Tabebuia*

chrysantha G. on the enzymes elastase and myeloperoxidase, involved in degranulation leukocyte process, was evaluated, identifying the potential direct inhibitory effect on the enzyme and/or inhibition of the desgranulation of polymorphonuclear neutrophils. Extracts of *Critoniella acuminata* and *Salvia rubescens* presented effects on the degranulation process and the inhibition of the enzyme elastase and myeloperoxidase; the extracts of *Phenax rugosus* do not showed significant effect. *Tabebuia chrysantha* methanolic extract only showed effect on inhibition of elastase activity.

Key words: *Critoniella acuminata*, degranulation, elastase, myeloperoxidase, *Phenax rugosus*, *Salvia rubescens*, *Tabebuia chrysantha*.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de inflamación es esencial el papel de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), que son las células leucocitarias predominantes en la inflamación aguda y las primeras células móviles en llegar al área afectada. Los PMNs se adhieren a las células epiteliales y atraviesan la pared de los vasos sanguíneos atraídos por factores quimiotácticos para desgranular-liberar enzimas que degradan el agente invasor (1).

Los neutrófilos desempeñan papeles normales o de defensa en los procesos inflamatorios, o anormales en alergias o enfermedades autoinmunes. En los procesos patológicos antes mencionados el arsenal enzimático rico en colagenasas y proteasas produce destrucción de los tejidos. Se ha propuesto que la excesiva actividad mieloperoxidasa y elastasa, así como las especies de oxígeno reactivas, están implicadas directamente en el daño tisular (2).

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosomal que se almacena principalmente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos polimorfonucleares humanos. La MPO se libera en vacuolas fagocíticas durante la activación celular y su grado de actividad está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo que la medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis y de la infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio, también es considerada como un indicativo de estrés oxidativo (3).

La elastasa es una metaloproteína con actividad enzimática proteasa, capaz de degradar el colágeno, los proteoglicanos del cartílago, la elastina (de ahí su nombre) y la membrana basal. Además puede convertir el fibrinógeno en fibrina y actuar sobre el comple-

mento a distintos niveles. Es una proteasa con una amplia gama de sustratos y existe la posibilidad de un amplio incremento de la actividad elastasa asociada a la infiltración y desgranulación de neutrófilos en los síndromes coronarios agudos (4).

Phenax rugosus (Poir.) Wedd (*Urticaceae*, n. v. esparietaria) y *Tabebuia chrysanta* G. Nicholson (*Bignoniaceae*, n. v. guayacán amarillo, cañahuate) son plantas empleadas en el eje cafetero colombiano por sus propiedades antiinfecciosas e inmunomoduladoras (5, 6, 7); también se ha reportado la presencia de saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y esteroides o triterpenoides para *Phenax rugosus*, y estos mismos metabolitos, además de alcaloides y taninos, para *Tabebuia chrysanta* (7). A la especie *Critoniella acuminata* (*Asteraceae*, n. v. patinegra) se le atribuyen propiedades desinfectantes, febrífugas y cicatrizantes; de esta planta se han aislado flavonoides, feniletilamidas, derivados del farneseno, ayapina y carbinol (8, 9). La *Salvia rubescens* (*Labiatae*, n. v. salvia colombiana) es empleada en el tratamiento de infecciones microbianas, hepatitis viral, enfermedades cardíacas, hemorragias, entre otros, y de las partes aéreas de *Salvia rubescens* se ha aislado un neoclerodano llamado amarisolide. En varios trabajos se ha mostrado que extractos de estas cuatro especies presentan efecto antiinflamatorio en modelos *in vivo* (9, 10).

El presente trabajo evaluó el efecto de los extractos metanólico y acuoso de *Critoniella acuminata*, *Salvia rubescens*, *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysanta* sobre las enzimas liberadas en el proceso de desgranulación leucocitaria: elastasa y mieloperoxidasa, determinando el potencial efecto inhibitorio directo sobre la enzima o la inhibición de la desgranulación de los PMNs.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Phenax rugosus se recolectó en la vereda El Guayabo, municipio de Cartago, Valle del Cauca (Colombia), a 1.400 m. s. n. m. y 22 °C de temperatura promedio, y *Tabebuia chrysantha* en la vereda Santágueda, municipio de Palestina, Caldas (Colombia), a 1.800 m. s. n. m. y a una temperatura promedio de 20 °C. Ambas especies fueron identificadas y clasificadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas y debidamente comparadas con las muestras de referencia 1016 para *Phenax rugosus* (Poir.) Wedd y 1525 para *Tabebuia chrysantha* G. Nicholson.

Las partes aéreas, con flores, de *Salvia rubescens* Kunth subsp. *Rubescens* se recolectaron en la parte baja del cerro de La Conejera, en la Sabana de Bogotá (2.600 m. s. n. m. / 14 °C), mientras que las partes aéreas, con flores, de *Critoniella acuminata*, se recolec-

taron en el kilómetro 15 de la vía Bogotá-Mesitas del Colegio (2.000 m. s. n. m. / 15° C). Ambas especies fueron identificadas y clasificadas en el Herbario Nacional Colombiano con números de *voucher* COL 434050 para *Salvia rubescens* y COL 311090 para *Critoniella acuminata*.

Obtención de extractos

Las hojas se lavaron con abundante agua destilada, se secaron en estufa a una temperatura de 40 °C durante 24 h, se pulverizaron y almacenaron en frascos ámbar a -4 °C hasta el momento de ser empleadas. Las muestras vegetales fueron sometidas a un proceso de maceración en agua fría, como se hace la preparación tradicional, y con metanol con el fin de extraer un mayor tipo y concentración de constituyentes. Se obtuvieron dos extractos, metanólico y acuoso de las especies objeto de estudio, los cuales se concentraron en rotavapor; el extracto metanólico se conservó en estado seco a -4 °C y el extracto acuoso fue liofilizado. Los extractos son identificados así: CM (extracto metanólico *Critonella acuminata*), CA (extracto acuoso de *Critonella acuminata*), SM (extracto metanólico de *Salvia rubescens*), SA (extracto acuoso de *Salvia rubescens*), PA (extracto acuoso de *Phenax rugosus*), PM (extracto metanólico de *Phenax rugosus*), TA (extracto acuoso de *Tabebuia chrysantha*), TM (extracto metanólico de *Tabebuia chrysantha*).

Obtención de polimorfonucleares

Los polimorfonucleares (PMNs) fueron obtenidos de sangre periférica humana: un volumen de sangre se mezcló en proporciones iguales con dextrán 3% en solución salina normal (SSN) y se dejó en reposo durante 20 min, el sobrenadante se centrifugó a 1.850 xg durante 5 min. El *pellet* fue suspendido en SSN y se colocó sobre Ficoll-Hypaque® en proporción 2:1 y se centrifugó por 20 min a 2.000 xg. Se eliminaron las dos capas superiores (plasma y mononucleares) y se recuperó el *pellet*, el cual fue lisado con solución hipotónica (NaCl 0,2%) por 30 s, posteriormente se adicionó un volumen igual de solución hipertónica (NaCl 1,6 %) y se centrifugó por 5 min a 1.850 xg. El proceso de lisis se realizó cuantas veces fue necesario para eliminar todos los eritrocitos presentes. Los PMNs se suspendieron en PBS pH 7,4 (11).

Citotoxicidad

Se realizó el ensayo de MTT (metil tiazol tetrazolio) para evaluar el posible efecto citotóxico de los extractos en estudio. En placas de 96 pozos, 200 µL de una suspensión de PMNs (5×10^6 células/mL) con 2 µL de la solución problema (Cf: 100 µg/mL) o 2 µL del vehículo (dimetil sulfoxido, DMSO) se incubaron durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se sometió a centrifugación a 1.850 xg por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se adicionó a cada pozo 100 µL de una solución de MTT 0,42 mg/mL en

HBSS (Hank's Buffered Salt Solution). Se incubó por 90 min a 37 °C. Nuevamente se centrifugó a 1.850 *xg* por 10 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 100 μL de DMSO y se agitó para solubilizar los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 495 nm. Se calculó el porcentaje de viabilidad con respecto al control, el cual se toma como el 100% de viabilidad (11).

Desgranulación leucocitaria

A 500 μL de una suspensión de PMNs ($2,5 \cdot 10^6$ células/mL) se agregaron 5 μL de citocalasina B (Cf: 100 μM) y 5 μL de f-MLP (N-formil- metionil- leucil- fenilalanina, Cf: 10 nM); la mezcla de reacción se incubó por 10 min a 37 °C. Posteriormente se centrifugó a 1.850 *xg* durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, al cual se denominó "fuente enzimática" (11).

Para determinar la actividad de los extractos evaluados sobre el proceso de desgranulación se preincubaron 500 μL de la suspensión de PMNs durante 5 min a 37 °C con 5 μL del extracto a evaluar (Cf: 100 $\mu\text{g/mL}$), posteriormente se adicionaron 5 μL de citocalasina B (Cf: 100 μM) y 5 μL de f-MLP (Cf: 10 nM) y se incubó nuevamente por 10 min a 37 °C. En los sobrenadantes recuperados después de la centrifugación (1.850 *xg*, 10 min, 4 °C) se determinó la actividad de elastasa y MPO como se describe a continuación.

Actividad elastasa

Se tomaron 250 μL del sobrenadante obtenido en el proceso de desgranulación y se incubaron durante 20 min a 37 °C con N- *ter*- butoxi- carbonil-L-alanina (*t*- BOC, Cf: 200 μM) como sustrato (5). La actividad de elastasa se determinó espectrofotométricamente mediante la cuantificación del *p*- nitrofeniléster liberado (415 nm).

Al evaluar el efecto de los extractos directamente sobre la actividad enzimática elastasa se siguió el procedimiento anterior, se tomaron 250 μL de "fuente enzimática" para ser incubados con 2,5 μL de cada extracto (Cf: 100 $\mu\text{g/mL}$) desde el inicio de la reacción.

Actividad MPO

Se tomaron 50 μL del sobrenadante obtenido en el proceso de desgranulación, se adicionó tampón PBS (pH 7,4), tampón fosfatos (pH 5,4), peróxido de hidrógeno (Cf: 0,3 μM) y se incubó por 5 min a 37 °C. Posteriormente se adicionó el sustrato TBM (tetrametilbencidina, Cf: 1,5 mM) y se incubó por 3 min a 37 °C. Para detener la reacción se agregaron 30 μL de acetato sódico 1,5 M (pH 3,0) y finalmente se determinó la absorbancia a 620 nm (11).

Cuando se evaluó el efecto de los extractos directamente sobre la actividad enzimática mieloperoxidasa se siguió el procedimiento anterior, se tomaron 250 μL de “fuente enzimática” para ser incubados con 2,5 μL de cada extracto (Cf: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) desde el inicio de la reacción.

Estadística

Los resultados son expresados como la media aritmética de los valores \pm desviación estándar de la media. Los datos fueron interpretados estadísticamente con un análisis de varianza simple (Anova), seguido de análisis de comparaciones múltiples (test de Tukey) con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran el efecto de los diferentes extractos sobre el proceso de desgranulación. En las tablas 1 y 2 se muestra el efecto de los extractos sobre el proceso de desgranulación medido por medio de la actividad mieloperoxidasa y elastasa. La mayoría de los extractos presentaron inhibición del proceso de desgranulación de elastasa en magnitudes similares, y es de resaltar los extractos TM y CM, que presentaron inhibiciones superiores al 60% (tabla 1). En cuanto a la actividad de los extractos frente a la actividad enzimática de elastasa (tabla 1), los porcentajes de inhibición no superan el 30%.

La actividad de los extractos ante el proceso de desgranulación de MPO fue muy baja (tabla 2), únicamente los extractos CA y CM presentaron inhibición de la actividad enzimática-MPO superior al 45%. Por otro lado, los extractos CA y SA presentaron porcentajes de inhibición de la actividad enzimática de mieloperoxidasa mayores al 80% (tabla 2).

En general los extractos de *Critoniella acuminata* presentaron mayor inhibición de la actividad enzimática; el extracto metanólico (CM) fue el que generó la mayor inhibición de la enzima elastasa, tanto en la inhibición de la desgranulación como en la inhibición de la actividad enzimática directa, mientras que el extracto acuoso mostró la inhibición más alta frente a MPO. Estos resultados están en concordancia con estudios previos en los que se demostró el efecto de la ayapina, componente de *C. acuminata*, a la cual se le atribuye parte de su actividad antiinflamatoria, inhibe de forma directa la elastasa (12).

El extracto metanólico de *Salvia rubescens* mostró inhibición de la desgranulación de elastasa, a la vez que el extracto acuoso inhibe únicamente en forma directa la actividad enzimática MPO. Estos resultados sugieren que los extractos de esta planta inhiben selectivamente el proceso de desgranulación o directamente la actividad en la fuente enzimática. En trabajos previos se demostró actividad antiinflamatoria *in vivo* para amarisolide, un compuesto aislado de esta planta, el cual inhibe de forma moderada la actividad MPO (12).

Los extractos metanólico y acuoso de *Tabebuia chrysanta* no presentaron actividad frente al proceso de desgranulación - MPO y la actividad enzimática de fuente de MPO, pero sí presentaron inhibición del proceso de desgranulación - elastasa (inhibición mayor al 50%). Aunque en una proporción baja, los extractos presentaron inhibición frente a la actividad enzimática de fuente de elastasa. Teniendo en cuenta los resultados ya expuestos, podemos sugerir que el modo de acción antiinflamatorio de la *T. chrysanta* está relacionado con la inhibición de elastasa tanto en el proceso de desgranulación leucocitaria como directamente ante la enzima.

Tabla 1. Efecto de los extractos sobre la actividad enzimática elastasa y el proceso de desgranulación leucocitaria.

Tratamiento	Desgranulación		Fuente enzimática	
	Absorbancia (415 nm)	Inhibición de la desgranulación (%)	Absorbancia (415 nm)	Inhibición de la actividad enzimática (%)
Control	1,329 ± 0,010	----	0,662 ± 0,006	----
CM	0,478 ± 0,027 ***	64,1 ± 2,0	0,506 ± 0,006**	23,6 ± 0,9
CA	0,615 ± 0,009 ***	53,7 ± 0,7	0,640 ± 0,068	9,2 ± 2,2
SM	0,573 ± 0,013 ***	56,9 ± 1,0	0,536 ± 0,008	19,0 ± 1,2
SA	0,565 ± 0,031 ***	57,5 ± 2,3	0,636 ± 0,008	4,0 ± 1,3
PM	0,669 ± 0,084 ***	49,6 ± 6,3	0,598 ± 0,028	9,7 ± 4,2
PA	0,765 ± 0,012 ***	42,5 ± 0,9	0,482 ± 0,009 **	27,2 ± 1,4
TM	0,503 ± 0,022 ***	62,2 ± 1,7	0,574 ± 0,027	13,3 ± 4,1
TA	0,650 ± 0,081 ***	51,1 ± 6,2	0,519 ± 0,109 **	31,0 ± 2,8

Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n = 3), test de Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. CM (extracto metanólico *Critonella acuminata*), CA (extracto acuoso de *Critonella acuminata*), SM (extracto metanólico de *Salvia rubescens*), SA (extracto acuoso de *Salvia rubescens*), PA (extracto acuoso de *Phenax rugosus*), PM (extracto metanólico de *Phenax rugosus*), TA (extracto acuoso de *Tabebuia chrysantha*), TM (extracto metanólico de *Tabebuia chrysantha*).

Tabla 2. Efecto de los extractos sobre la actividad enzimática mieloperoxidasa (MPO) y el proceso de desgranulación leucocitaria.

Tratamiento	Desgranulación		Fuente enzimática	
	Absorbancia (620 nm)	Inhibición de la desgranulación (%)	Absorbancia (620 nm)	Inhibición de la actividad enzimática (%)
Control	0,325 ± 0,037	-----	1,230 ± 0,022	-----
CM	0,131 ± 0,034**	46,8 ± 1,8	0,429 ± 0,029 ***	65,1 ± 2,3
CA	0,095 ± 0,016 ***	70,6 ± 4,8	0,179 ± 0,016 ***	85,4 ± 1,3
SM	0,309 ± 0,007	4,9 ± 2,4	0,564 ± 0,026 ***	54,2 ± 2,1
SA	0,331 ± 0,034	-2,7 ± 1,8	0,198 ± 0,010 ***	83,9 ± 0,8
PM	0,330 ± 0,013	-1,6 ± 4,0	0,846 ± 0,012 ***	31,2 ± 1,0
PA	0,339 ± 0,019	-4,4 ± 4,4	1,170 ± 0,005	4,9 ± 0,4
TM	0,368 ± 0,009	-4,1 ± 2,9	1,273 ± 0,088	1,6 ± 0,2
TA	0,328 ± 0,025	-0,8 ± 7,6	1,235 ± 0,213	-5,6 ± 2,0

Los resultados se expresan como la media ± D.E. (n = 3), test de Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. CM (extracto metanólico *Critonella acuminata*), CA (extracto acuoso de *Critonella acuminata*), SM (extracto metanólico de *Salvia rubescens*), SA (extracto acuoso de *Salvia rubescens*), PA (extracto acuoso de *Phenax rugosus*), PM (extracto metanólico de *Phenax rugosus*), TA (extracto acuoso de *Tabebuia chrysantha*), TM (extracto metanólico de *Tabebuia chrysantha*).

Los extractos acuoso y metanólico de *Phenax rugosus* mostraron comportamiento similar entre ellos, ya que no inhiben el proceso de desgranulación - MPO, aunque logran una inhibición moderada de desgranulación - elastasa (alrededor del 50%).

En conclusión, todos los extractos evaluados inhiben la desgranulación de elastasa, mientras que solo los extractos de *Critoniella acuminata* presentan inhibición de la desgranulación de mieloperoxidasa. De manera directa los extractos de *Critoniella acuminata* y *Salvia rubescens* inhiben la actividad de mieloperoxidasa en la fuente enzimática. Este trabajo contribuye al establecimiento de posibles modos de acción antiinflamatorios para dichas especies vegetales usadas con fines medicinales.

REFERENCIAS

1. W. Rojas, "Inmunología", Medellín, Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, 1996, pp. 146-148.
2. J. Smith, Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword, *J. Leukocyte Biol.*, **56**, 72 (1994).
3. H. Cheng, B. Xia, L. Zhang, F. Zhou, Y. Zhang, M. Ye, Z. Hu, J. Li, Z. Z. Wang, Matrine improves 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice, *Pharmacol. Res.*, **53**, 202 (2006).
4. P.A. Henriksen, J.M. Sallénave, Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis, *Biochem. Cell Biol.*, **40**, 1095 (2008).
5. J.E. Pérez, G. Isaza, S. Acosta, Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*, *Biosalud*, **6**, 59 (2007).
6. L.F. Ospina, D.M. Aragón, N.E. Vergel, G. Isaza, J.E. Pérez, Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Phenax rugosus* (Poir.) Wedd and *Tabebuia chrysantha* G. Nicholson, *Vitae*, **18**, 49 (2011).
7. J.E. Pérez, G. Isaza, J.G. Bueno, M.C. Arango, B.L. Hincapié, A.M., D.P. Londoño, Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas, *Rev. Med. Risaralda*, **10**, 13 (2004).
8. C.E. Muñoz, N.E. Vergel, D.M. Aragón, L.F. Ospina, Efecto antinociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **38**, 31 (2009).
9. F. González, M. Vesga, "Caracterización química de algunos metabolitos secundarios de *Critoniella acuminata* (H.B.K) R.M. King & H. Robinson y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria", tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia, 2003.
10. A. Velásquez, "Efecto antiinflamatorio y antioxidante de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional colombiana", tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, 2002.

11. H. Correa, A.L. Valenzuela, L.F. Ospina, C. Duque, Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean), *J. Inflammation*, **6**, 5 (2009).
12. M. Rodríguez, N. Vergel, L.F. Ospina, J. Calle, R. Pinzón, Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **34**, 35 (2004).