

# Universidad Católica de Santa María

## Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

### Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



### EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE COMPUESTOS TIPO NITRONA USANDO UN MODELO DE CÉLULAS RAW 264.7 ACTIVADAS POR LIPOPOLISACÁRIDO

Tesis presentada por la Bachiller:

**Román Aguilar, Airton Junot**

para optar el Título Profesional de

**Químico Farmacéutico**

Asesora:

**Dra. Vera López Karin**

**Arequipa – Perú**

**2021**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FARMACIA Y BIOQUIMICA TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 24 de diciembre del 2020

**Dictamen: 001601-C-EPFyB-2020**

Visto el borrador de tesis del expediente 001601, presentado por:

**2012152391 - ROMAN AGUILAR AIRTON JUNOT**

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTINFLAMATORIA DE COMPUESTOS  
TIPO NITRONA USANDO UN MODELO DE CÉLULAS RAW 264.7  
ACTIVADAS POR LIPOPOLISACÁRIDO**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO  
DICTAMINADOR**



**2347 - GUILLEN NUÑEZ MARIA ELENA  
DICTAMINADOR**



**3137 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS  
DICTAMINADOR**



## DEDICATORIA

*A mi madre Romelia Luz Aguilar Lazo, que se encuentra en compañía de Dios nuestro Señor por su apoyo incondicional, sus consejos para no rendirme, su bendición y cuidados, esto es para tí que eres la madre más maravillosa del mundo y siempre estarás a mi lado.*



*A mis abuelos Edgar, María, Néstor y Luz por su apoyo en los momentos más difíciles y su constante guía para seguir adelante en la vida.*



*A mis hermanos Jair, Sebastián y Andrea los cuales me brindan una sonrisa y alegría en los momentos adversos que la vida pone, gracias a ustedes.*



## AGRADECIMIENTOS

*Mi mayor agradecimiento y gratitud a todos los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, por las enseñanzas, consejos y apoyo brindado en mi formación profesional y personal durante toda mi carrera universitaria.*

*Agradecer a mi asesora Dra. Karín Vera López por el gran apoyo que me brindó al momento de realizar y culminar este trabajo.*

*A mis dictaminadores quienes se merecen mi especial reconocimiento por el interés mostrado en mi investigación y las sugerencias recibidas, a cada uno de ellos Dra. María Elena Guillén Nuñez, Dra. Rita Milagros Nieto Montesinos y Dr. Jose Antonio Villanueva Salas por su ayuda, sus sabios consejos y experiencia me dieron la clave para terminar esta meta.*

*A la Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar por brindarme la oportunidad de haber podido salir del Perú para poder aprender más sobre mi carrera y todo lo que engloba ser Químico Farmacéutico.*

*Expresar también mi agradecimiento al Dr. Darío Gómez docente e investigador de la Universidad Nacional de San Luis Argentina por haberme apoyado en la realización del presente trabajo.*

*Airton Junot Román Aguilar*

## RESUMEN

La inflamación es uno de los procesos biológicos más comunes de nuestro organismo, la cual se presenta en respuesta a la presencia de cuerpos extraños. Hoy en día la terapia antiinflamatoria está compuesta por terapias mixtas, las cuales pueden presentar reacciones adversas, por ello la necesidad e importancia de investigar nuevos compuestos que no presenten estas reacciones, como los compuestos tipo nitrona.

La *N*-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina, fue la primera nitrona a la que se le comprobó propiedades antiinflamatorias, lo que llevo a la realización del presente proyecto el cual tuvo como objetivo evaluar la actividad antiinflamatoria de nuevas nitronas en un modelo de células RAW 264.7.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antiinflamatoria inducida por lipopolisacárido de compuestos tipo nitrona en un modelo de células RAW 264.7.

El presente estudio se subdividió en tres partes: En primer lugar, se elaboró una curva de calibración de nitrito de sodio, empleando 6 concentraciones distintas (1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu$ M) preparadas a partir una solución stock de 10 mM, seguido se colocaron 50  $\mu$ L/pozo, se incubó la placa por 24 horas a 38 °C, y se realizó la lectura de la placa a 550 nm. Conjuntamente se preparó el LPS a partir de una solución stock de 500 ng/mL, se realizaron diluciones seriadas a concentraciones finales de 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 ng/mL, estas diluciones fueron almacenadas en el refrigerador a 3 °C.

En segundo lugar, se realizó el tratamiento de las células, previamente se hizo un cultivo celular en monocapa de células RAW 264.7 en medio completo DMEN. Se obtuvieron  $1,4 \times 10^5$  células vivas/mL y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo para llevar a incubación por 24 horas a 38°C. Después de la incubación de las células se observó en el microscopio para comprobar su adhesión en la placa, continuando con la adición de 50  $\mu$ L/pozo de LPS y la incubación de la misma a 38 °C por 24 horas. Posterior a la incubación se procedió a realizar un ensayo de MTT, con el fin de comprobar el efecto del LPS sobre la viabilidad celular, para poder determinar la concentración más adecuada para su uso.

Conjuntamente se realizó el ensayo de MTT con los compuestos tipo nitrona (LQB-106, LBQ-109, LBQ-110, LBQ-124, LBQ-131, LBQ-134, LBQ-141, LBQ-467 y LBQ-476) a una concentración del 5 %, para comprobar el efecto sobre la viabilidad celular.

En tercer lugar, se procedió a realizar el ensayo para determinar la cantidad de nitrito formado por las células después de haber sido activadas por LPS, se realizó un cultivo celular en monocapa de células RAW 264.7 incubado por 24 horas a 38°C, después se adicionó el LPS en las concentraciones óptimas, se adicionó los compuestos tipo nitrona procediendo con la incubación por 24 horas a 38°C, para finalizar el ensayo se preparó el reactivo de Griess mezclando por cantidades iguales el reactivo A y B, después de la mezcla se adicionó 50 uL/pozo a la placa, se dejó incubar por 24 horas a 38°C.

Después de haber realizado una curva de calibración de nitrito por medio de diluciones seriadas a partir de una solución stock de 10 mM en agua ultrapura se obtuvieron 6 concentraciones diferentes 1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu$ M, obteniéndose una buena linealidad ( $r^2$ :0.998). Se determinó que las concentraciones de LPS más adecuadas para activar las células RAW 264.7 son: 0.5, 1 y 5 ng/mL debido a que presentaron una viabilidad celular por encima del 40%. A su vez se comprobó que los compuestos tipo nitrona al 5% que fueron evaluados (C1 (LQB-106), C2 (LBQ-109), C3 (LBQ-110), C4 (LBQ-124), C5 (LBQ-131), C6 (LBQ-134), C7 (LBQ-141), C8 (LBQ-467) y C9 (LBQ-476)), no son tóxicos para las células RAW 264.7, ya que todos presentaron una viabilidad celular mayor al 92%.

Se observó que las células RAW 264.7 tratadas con los compuestos tipo nitrona producen entre 5.1 y 13.2  $\mu$ M de nitrito, esta concentración es 95 a 98% inferior al producido por LPS. Finalmente se comprobó que los compuestos tipo nitrona disminuyen considerablemente los niveles de nitrito en las células después de haber sido tratadas con LPS a concentraciones 0.1, 1 y 5 ng/mL, entre 94 y 99% la cual es inferior al producido por LPS a diferentes concentraciones. En este experimento, la formación de una trampa de spin entre los compuestos tipo nitrona y los radicales libres formados por las células activadas podría ser el mecanismo responsable de la capacidad antiinflamatoria de los compuestos estudiados.

Palabras clave: Nitrona, Lipopolisacárido, Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, Griess.

## ABSTRACT

Inflammation is one of the most common biological processes in our body, which occurs in response to the presence of foreign bodies. Nowadays, anti-inflammatory therapy is composed of mixed therapies, which can present adverse reactions, hence the need and importance of investigating new compounds that do not present these reactions, such as nitron-type compounds.

N-oxido-5,5-dimethyl-1-pyrroline was the first nitron to which anti-inflammatory properties were proven, which led to the realization of this project which aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of new nitrones in a RAW 264.7 cell model.

The objective of the present study was to evaluate the lipopolysaccharide-induced anti-inflammatory activity of nitron-like compounds in a RAW 264.7 cell model.

The present study was subdivided into three parts: First, a sodium nitrite calibration curve was elaborated, using 6 different concentrations (1, 5, 10, 50, 100 and 500  $\mu\text{M}$ ) prepared from a stock solution of 10 mM, followed by 50  $\mu\text{L}$  / well, the plate was incubated for 24 hours at 38 ° C, and the plate was read at 550 nm. Together, the LPS was prepared from a stock solution of 500 ng / mL, serial dilutions were made at final concentrations of 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100 ng / mL, these dilutions were stored in the refrigerator at 3 ° C.

Second, the treatment of the cells was carried out, previously a primary cell culture was made in a monolayer of RAW 264.7 cells in complete DMEN medium.  $1.4 \times 10^5$  live cells / mL were obtained and 100  $\mu\text{L}$  / well were placed for incubation for 24 hours at 38 ° C. After incubation, the cells were observed under the microscope to check their adhesion to the plate, continuing with the addition of 50  $\mu\text{L}$  / well of LPS and its incubation at 38 ° C for 24 hours. After incubation, an MTT test was carried out, in order to verify the effect of LPS on cell viability, in order to determine the most suitable concentration for its use.

The MTT test was carried out together with the nitron-type compounds (LQB-106, LBQ-109, LBQ-110, LBQ-124, LBQ-131, LBQ-134, LBQ-141, LBQ-467 and LBQ-476) at a concentration of 5%, to check the effect on cell viability.

Third, the assay was carried out to determine the amount of nitrite formed by the cells after being activated by LPS, a primary cell culture was carried out in a monolayer of

RAW 264.7 cells incubated for 24 hours at 38 ° C, then LPS was added in optimal concentrations, nitrone-type compounds were added proceeding with incubation for 24 hours at 38 ° C, to end the test, the Griess reagent was prepared by mixing reagent A and B in equal amounts, after The mixture was added 50 uL / well to the plate, it was left to incubate for 24 hours at 38 ° C.

After having made a nitrite calibration curve by means of serial dilutions from a stock solution of 10 mM in ultrapure water, 6 different concentrations 1, 5, 10, 50, 100 and 500  $\mu$ M were obtained, obtaining a good linearity ( $r^2$ : 0.998). It was determined that the most suitable concentrations of LPS to activate RAW 264.7 cells are: 0.5, 1 and 5 ng / mL because they presented a cell viability above 40%. In turn, it was found that the 5% nitrone-type compounds that were evaluated (C1 (LBQ-106), C2 (LBQ-109), C3 (LBQ-110), C4 (LBQ-124), C5 (LBQ-131), C6 (LBQ-134), C7 (LBQ-141), C8 (LBQ-467) and C9 (LBQ-476)), are not toxic to RAW 264.7 cells, since they all presented cell viability greater than 92 %.

It was observed that RAW 264.7 cells treated with nitrone-type compounds produce between 5.1 and 13.2  $\mu$ M of nitrite, this concentration is 95 to 98% lower than that produced by LPS. Finally, it was found that nitrone-type compounds considerably decrease nitrite levels in cells after being treated with LPS at concentrations 0.1, 1 and 5 ng / mL, between 94 and 99%, which is lower than that produced by LPS at different levels. concentrations.

In this experiment, the formation of a spin trap between the nitrone-like compounds and the free radicals formed by the activated cells could be the mechanism responsible for the anti-inflammatory capacity of the compounds studied.

Keywords: Nitrone, Lipopolysaccharide, Dulbecco's Modified Eagle Culture Medium, Griess.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es una de las respuestas biológicas del cuerpo frente a agentes extraños al mismo, los tejidos vasculares se ven afectados cuando existe la presencia de estímulos nocivos: patógenos, químicos o lesiones físicas. La principal característica de la inflamación es el aumento del movimiento de las diferentes células del sistema inmune innato (neutrófilos y macrófagos) de la sangre a los tejidos dañados. Existen signos patrón propios de la inflamación los cuales son el aumento del flujo sanguíneo, un elevado metabolismo celular, vasodilatación por liberación de mediadores de la misma como el óxido nítrico entre otros (1). Sin embargo, cuando el control homeostático se sale de control y no cumple con su labor de defensa, la inflamación es la partícipe de complicaciones contribuyendo a la aparición y en la gran mayoría de casos el avance de diferentes enfermedades: renales, cardíacas, hepáticas, etc. (2).

Actualmente en el Perú y en el mundo la terapia más usada frente a la inflamación es el uso de AINES que en la gran mayoría de casos van acompañados de relajantes musculares, antipiréticos y otros fármacos, principalmente cuando la inflamación es producida por una infección bacteriana la cual necesita el uso de antibióticos, pero a su vez estas terapias mixtas muchas veces presentan efectos secundarios no deseados.

Anteriormente se realizaron estudios sobre la eficacia frente a la inflamación producida por LPS de sustancias que tenían como estructura base N-óxido de imina las cuales llevan el nombre de nitronas, la nitrona más estudiada es el DMPO (*N*-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina) la cual mostró resultados óptimos frente a la inflamación.

Considerando estas premisas problemáticas, el presente estudio evalúa la actividad antiinflamatoria in vitro de diferentes nitronas las cuales fueron sintetizadas en la Universidad de Río de Janeiro en células RAW 264.7 las cuales fueron activadas por LPS, mediante la medición de los niveles de nitrito producido por las células después de haber sido tratadas con las sustancias antes mencionadas en respectivo orden. El estudio fue dividido en tres etapas para una óptima organización y ejecución en la parte experimental.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>vii</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>i</b>
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>ii</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1. NITRONA.....	1
1.1. Estructura .....	1
1.2. Presencia en productos naturales.....	2
1.3. Presencia como metabolitos en drogas.....	2
1.4. Síntesis de nitronas .....	4
1.4.1. N-alkilación de oximas .....	4
1.4.2. Oxidación de aminas e iminas.....	5
1.4.3. Condensación de aldehídos con N-alkil o N-arylhidroxilaminas.....	5
2. INFLAMACIÓN .....	6
2.1. Concepto .....	6
2.2. Características generales.....	6
2.3. Causas.....	7
2.4. Signos clínicos de la inflamación .....	7
2.5. Diagnóstico.....	8
2.6. Clasificación de la inflamación .....	8
2.7. Fisiopatología de la inflamación.....	10
2.7.1. Cambios Vasculares.....	10
2.7.2. Cambios celulares.....	10
2.7.2.1. Marginación .....	11
2.7.2.2. Rodadura .....	11
2.7.2.3. Adhesión.....	11
2.7.2.4. Transmigración o diapédesis.....	11
2.7.2.5. Quimiotaxis .....	11
2.7.2.6. Fagocitosis.....	12
2.8. Amplificación de la respuesta inflamatoria.....	12
2.8.1. Sistema inmunitario innato.....	12

2.8.2.	Sistema inmunitario adquirido.....	13
2.9.	Mediadores químicos de la inflamación .....	13
2.9.1.	Sistema de complemento.....	13
2.9.2.	Aminas vasoactivas .....	14
2.9.3.	Metabolitos del ácido araquidónico .....	14
2.9.4.	Óxido nítrico .....	15
3.	LIPOPOLISACÁRIDO .....	16
3.1.	Concepto .....	16
3.2.	Estructura del lipopolisacárido.....	16
3.3.	Función del lipopolisacárido.....	18
4.	MACRÓFAGOS.....	19
4.1.	Células RAW .....	20
4.2.	Mecanismo de activación del macrófago por lipopolisacárido.....	21
5.	Factor de transcripción nuclear <i>kappa beta</i> .....	22
5.1.	Características de NF- $\kappa$ B.....	22
6.	Familia de factores NF- $\kappa$ B.....	23
6.1.	Señalización por la vía NF- $\kappa$ B.....	23
6.1.1.	Vía canónica de la activación de NF- $\kappa$ B.....	23
6.1.2.	Vía no canónica de la activación de NF- $\kappa$ B.....	24
6.1.3.	Vía atípica de la activación de NF- $\kappa$ B.....	25
6.1.4.	Genes regulados por NF- $\kappa$ B.....	26
6.1.5.	Efectos de los productos génicos activados por NF- $\kappa$ B.....	26
6.1.6.	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno .....	27
6.1.6.1.	Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	27
6.1.6.2.	Producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS).....	27
6.1.6.3.	Efectos biológicos de las RNS .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>30</b>
1.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	30
2.	MATERIALES .....	30
2.1.	Material biológico .....	30
2.1.1.	Células RAW 264.7 .....	30
2.1.2.	Suero fetal bovino .....	30
2.1.3.	Lipopolisacárido bacteriano .....	31
2.2.	Material químico .....	31
2.2.1.	Compuestos tipo nitrona.....	31
2.2.2.	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEN) .....	31

2.3.	Material de laboratorio .....	31
2.3.1.	Material de vidrio .....	31
2.3.2.	Equipos de laboratorio .....	31
2.3.3.	Reactivos y fármacos .....	32
2.3.4.	Otros materiales .....	32
3.	MÉTODOS .....	33
3.1.	Diseño experimental .....	33
3.1.1.	Efecto del LPS y los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular .....	33
3.1.2.	Evaluación de la capacidad antiinflamatoria .....	34
3.2.	Preparación del medio de cultivo celular y cultivo de células RAW 264.7 .....	35
3.2.1.	Fundamento .....	35
3.2.2.	Preparación del medio de cultivo completo .....	35
3.2.3.	Cultivo de células RAW 264.7 .....	35
3.3.	Elaboración de la curva de calibración .....	36
3.3.1.	Fundamento .....	36
3.3.2.	Preparación .....	36
3.4.	Elaboración del reactivo de Griess .....	37
3.4.1.	Fundamento .....	37
3.4.2.	Preparación del reactivo A .....	37
3.4.3.	Preparación del reactivo B .....	38
3.5.	Preparación del LPS y compuestos tipo nitrona .....	38
3.5.1.	Preparación del LPS bacteriano .....	38
3.5.2.	Elaboración de soluciones a partir de compuestos tipo nitrona .....	38
3.6.	Pase celular .....	38
3.7.	Ensayo de viabilidad celular MTT .....	39
3.7.1.	Fundamento .....	39
3.7.2.	Efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular .....	39
3.7.2.1.	Efecto del LPS sobre la viabilidad celular .....	39
3.7.2.2.	Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular .....	40
3.8.	Evaluación de la capacidad antiinflamatoria .....	40
3.8.1.	Ensayo de producción de nitrito .....	40
3.9.	Análisis estadístico .....	41
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>42</b>
1.	Curva de calibración de nitrito .....	42
2.	Ensayo de viabilidad celular MTT .....	43
2.1.	Efecto del LPS sobre la viabilidad celular .....	43

2.2.	Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular .....	45
3.1.	Ensayo de producción de nitrito .....	49
3.1.1.	Producción de nitrito por los compuestos tipo nitrona .....	50
3.1.2.	Compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL .....	53
3.1.3.	Compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL .....	56
3.1.4.	Compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL .....	59
4.	Análisis de varianza .....	62
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>64</b>
<b>SUGERENCIAS .....</b>		<b>65</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>		<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>71</b>
<b>ANEXO N°1</b>	<b>COMPUESTOS TIPO NITRONA</b>	
.....		72
<b>ANEXO N°2</b>	<b>Efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular</b>	
.....		73
<b>ANEXO N°3</b>	<b>Ensayo de producción de nitrito compuestos tipo nitrona y compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/ml.....</b>	74
<b>ANEXO N°4</b>	<b>Ensayo de producción de nitrito compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL y 5 ng/mL .....</b>	75
<b>ANEXO N°5</b>	<b>Incubación de células RAW</b>	264.7
.....		76

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Pág.</b>	
	<b>TABLA N°1:</b> Localización y función de macrófagos ..... 2020
	<b>TABLA N°2:</b> Absorbancias de la curva de calibración..... 42
	<b>TABLA N°3:</b> Efecto del LPS sobre la viabilidad celular..... 44
	<b>TABLA N°4:</b> Test de ANOVA del efecto de las diferentes concentraciones de LPS sobre la viabilidad celular..... 45
	<b>TABLA N°5:</b> Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de LPS sobre la viabilidad celular..... 45
	<b>TABLA N°6:</b> Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular..... 46
	<b>TABLA N°7:</b> Test de ANOVA del efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular..... 47
	<b>TABLA N°8:</b> Test de Tukey del efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular..... 48
	<b>TABLA N°9:</b> Test de Dunnett sobre del efecto de los compuestos tipo nitrona con el control negativo..... 48
	<b>TABLA N°10:</b> Producción de nitrito por compuestos tipo nitrona ..... 50
	<b>TABLA N°11:</b> Test de ANOVA sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona ..... 51
	<b>TABLA N°12:</b> Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona..... 52
	<b>TABLA N°13:</b> Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona..... 52
	<b>TABLA N°14:</b> Producción de nitrito con LPS 0.5 ng/mL..... 53
	<b>TABLA N°15:</b> Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 0.5 ng/mL..... 54
	<b>TABLA N°16:</b> Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL..... 55
	<b>TABLA N°17:</b> Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL..... 55
	<b>TABLA N°18:</b> Producción de nitrito con LPS 1 ng/mL..... 56
	<b>TABLA N°19:</b> Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 1 ng/mL..... 57
	<b>TABLA N°20:</b> Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL..... 58
	<b>TABLA N°21:</b> Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL..... 58
	<b>TABLA N°22:</b> Producción de nitrito con LPS 5 ng/mL..... 60
	<b>TABLA N°23:</b> Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 5 ng/mL..... 60
	<b>TABLA N°24:</b> Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL..... 61

**TABLA N°25:** Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL..... 61

**TABLA N°26:** Actividad antiinflamatoria, ensayo de producción de nitrito. (n=9) ..... 62

**TABLA N°27:** Análisis de varianza. .... 62

### ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Pág.</b>
<b>ESQUEMA N°1.</b> Nitronas como metabolitos de fármacos.....	3
<b>ESQUEMA N°2.</b> Síntesis de nitronas .....	4
<b>ESQUEMA N°3.</b> N-alquilación de oximas.....	5
<b>ESQUEMA N°4.</b> Oxidación de aminas .....	5
<b>ESQUEMA N°5.</b> Formación de especies reactivas de oxígeno .....	28
<b>ESQUEMA N°6.</b> Formación de especies reactivas de nitrógeno.....	28
<b>ESQUEMA N°7.</b> Reacción de diazotación de Griess .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.	
	<b>FIGURA N°1.</b> Estructura base de las nitronas..... 1
	<b>FIGURA N°2.</b> Productos naturales con la mitad nitrona ..... 2
	<b>FIGURA N°3.</b> Estructura general del LPS..... 18
	<b>FIGURA N°4.</b> Reconocimiento y vías de transducción del LPS ..... 19
	<b>FIGURA N°5.</b> Macrófagos teñidos con tinción de Wright-Giemsa..... 20
	<b>FIGURA N°6.</b> Células RAW 264.7, 100x ..... 21
	<b>FIGURA N°7. A-</b> Unión del LPS al complejo receptor. <b>B-</b> Cascada intracelular activada por la unión del LPS al receptor ..... 22
	<b>FIGURA N°8.</b> Activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B ..... 24
	<b>FIGURA N°9.</b> Activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B ..... 25
	<b>FIGURA N°10.</b> Activación de la atípica de NF- $\kappa$ B..... 26
	<b>FIGURA N°11.</b> Células RAW 264.7 ..... 30
	<b>FIGURA N°12.</b> Placa de 96 pozos con la distribución usada para la evaluación del efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular. .... 33
	<b>FIGURA N°13.</b> Placa de 96 pozos con la distribución usada para evaluar la capacidad antiinflamatoria ..... 35
	<b>FIGURA N°14.</b> Matraz T75 con medio completo y células RAW 264.7 ..... 36
	<b>FIGURA N°15.</b> Diluciones seriadas ..... 37
	<b>FIGURA N°16.</b> Centrifugación de células RAW 264.7 levantadas..... 39
	<b>FIGURA N°17.</b> Ensayo de producción de nitrito..... 41
	<b>FIGURA N°18.</b> Curva de calibración de nitrito..... 43
	<b>FIGURA N°19.</b> Efecto del LPS sobre la viabilidad celular ..... 44
	<b>FIGURA N°20.</b> Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular ..... 47
	<b>FIGURA N°21.</b> Ensayo de producción de nitrito compuesto tipo nitrona sin presencia de LPS..... 51
	<b>FIGURA N°22.</b> Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL ..... 55
	<b>FIGURA N°23.</b> Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL ..... 58
	<b>FIGURA N°24.</b> Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL ..... 58

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiinflamatoria de compuestos tipo nitrona en un modelo de células RAW 264.7 activadas por lipopolisacárido.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración adecuada de lipopolisacárido para la evaluación del efecto antiinflamatorio.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos tipo nitrona.
3. Determinar que nitronas tendrán un mejor efecto antiinflamatorio.
4. Evaluar la actividad de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

## HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes de estudios previos realizados del efecto antiinflamatorio de la nitrona DMPO (*N*-óxido-5,5-dimetil-1-pirrolina), es probable que sustancias tipo nitrona diferentes a la mencionada presenten un efecto antiinflamatorio en un modelo experimental *in vitro*.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. NITRONA

##### 1.1. Estructura

Los diferentes tipos de enlaces nitrógeno-carbono se encuentran entre los enlaces de tipo covalente más abundantes en el medio ambiente y en la naturaleza, estando presentes en moléculas vitales estratégicas como aminoácidos, proteínas, alcaloides y diferentes bases nitrogenadas.

Diferentes compuestos nitrogenados como aminas, enaminas, iminas, derivados nitro, N-alquilhidroxilaminas, amidas y nitrilos, se discuten en los libros de texto de química orgánica y química bioorgánica, pero se ha prestado poca o ninguna atención al grupo nitrona. Incluso en los libros de química orgánica avanzada, las nitronas solo se analizan cuando se abordan las reacciones de [3+2]-cicloaddición y algunas reacciones de aminas terciarias (3).

Los compuestos nitronas contienen el grupo funcional N-óxido de imina como estructura base, también son conocidas como N-óxido de azometina (Figura 1). Estos compuestos fueron descubiertos por accidente gracias al científico Alemán E. Beckman en 1890, durante la N-alquilación de oximas. Más adelante Pfeiffer, propuso el término "nitrona" en 1916, como una contracción de nitrógeno y cetona, con el objetivo de indicar la relación química entre nitronas y compuestos de carbonilo. Los términos generales aldonitronas ( $R_2 = H$ ,  $R_1 = R_3 = C$ ) y cetonitronas ( $R_1 = R_2 = R_3 = C$ ), se han usado para diferencias entre compuestos preparados a partir de aldehídos y cetonas (4).

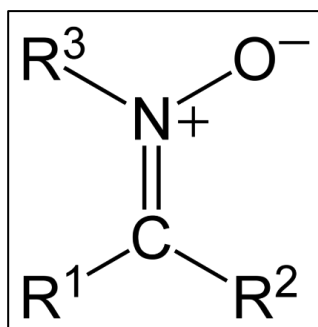


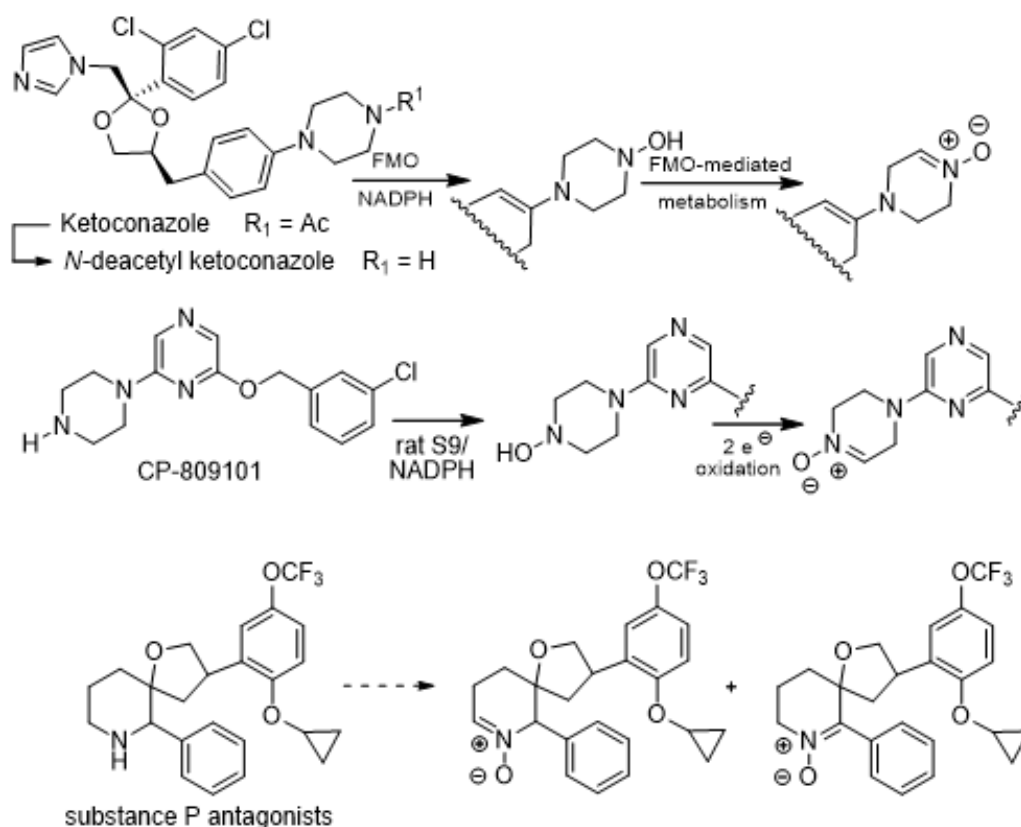
FIGURA N°1: Estructura base de las nitronas (5)



espectro de masas de N-hidroxilación del nitrógeno de piperazina, seguida de la oxidación de dos electrones cuya finalidad fue generar la nitrona correspondiente (8).

La amina secundaria que se encuentra en los antagonistas de la sustancia P, es potencialmente útil para el tratamiento de la depresión mayor en personas con problemas psiquiátricos y psicológicos. La prometazina es un fármaco neuroléptico y un antihistamínico de primera generación perteneciente a la familia de las fenotiazinas. Los diferentes estudios en las fracciones sobrenadantes de homogeneizado de hígado de conejo dieron como resultado la formación del compuesto tipo nitrona (9).

También se encontraron nitronas como metabolitos formando parte de la estructura base del lapatinib, este fármaco es un inhibidor potente y reversible de ErbB1 y ErbB2 que pertenece a la familia de las tirosina-quinasas, actualmente utilizado en el cáncer de mama metastásico y cáncer de colon (10).

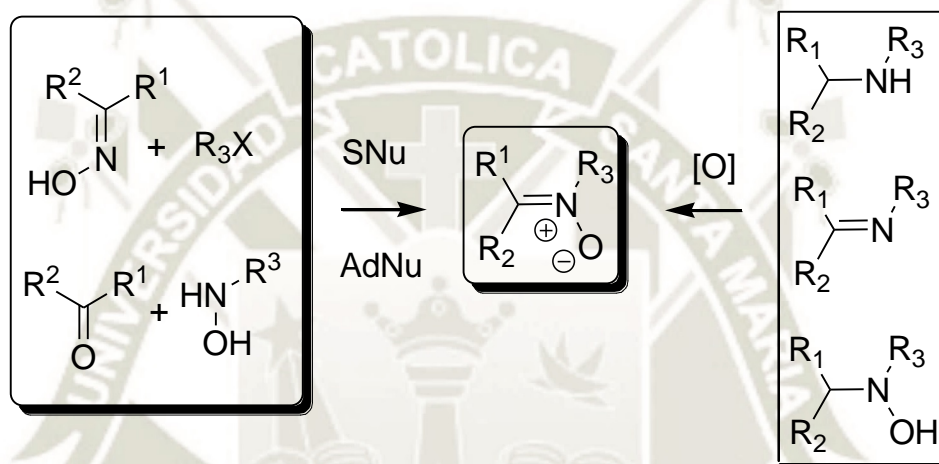


**ESQUEMA N°1:** Nitronas como metabolitos de fármacos

## 1.4. Síntesis de nitronas

Los compuestos tipo nitrona son intermedios sintéticos versátiles y variables, que permiten la síntesis de compuestos más complejos, en especial para preparar compuestos mediante reacciones de cicloadición [3 + 2].

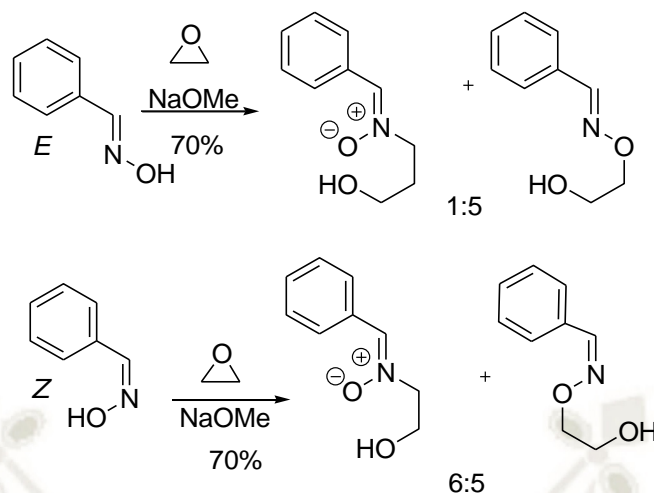
Los compuestos tipo nitrona pueden prepararse por condensación diferentes aldehídos con N-alkil o N-arilhidroxilaminas, por N-alkilación de oximas, en reacciones de sustitución nucleofílica o por oxidación de aminas secundarias e hidroxilaminas (esquema 2).



ESQUEMA N°2: Síntesis de nitronas (11).

### 1.4.1. N-alkilación de oximas

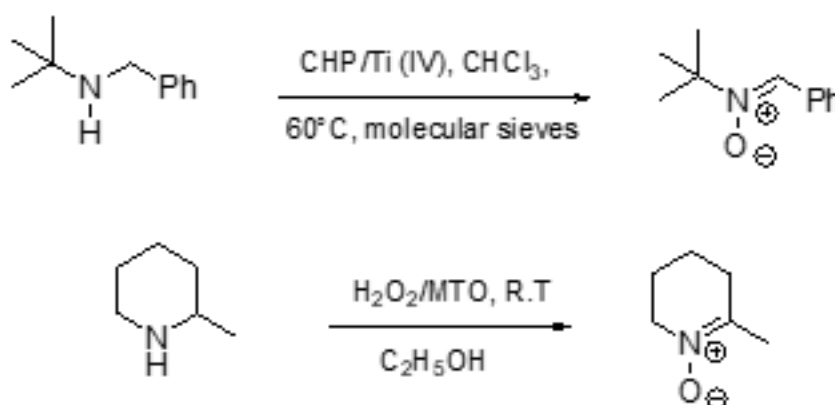
La N-alkilación de oximas fue uno de los primeros métodos investigados, usados y descritos para la síntesis de nitronas. La oxima es un compuesto de simple y fácilmente disponible para la preparación de  $\alpha$ -aril-N-(2-hidroxietil) nitronas. Estos compuestos tienen característica nucleofílica ambidente y tanto el N como el O pueden actuar como sitio reactivo en la reacción, dependiendo de las condiciones en las cuales se trabaje el proceso. Además, la orientación de la alquilación (O "o" N) de las oximas con haluros de alquilo y radical metoxilo tiene una dependencia directa en la configuración E o Z de la oxima utilizada (esquema 3).



ESQUEMA N°3: N-alkilación de oximas (12).

#### 1.4.2. Oxidación de aminas e iminas

La reacción de oxidación a partir de aminas a nitronas es una reacción que proporciona el método más convergente y general para la preparación de nitronas. Esta oxidación se puede realizar con diferentes agentes oxidantes siendo el más utilizado el MCPBA. También se han descrito en la literatura otros oxidantes como reactivo de Davis, oxona, dimetildioxirano, N-metilmorfolina, N-óxido y peróxido el cual es un oxidante primario en presencia de un catalizador (1-8% mol) como  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{MeReO}_3$ ,  $\text{SeO}_2$  o  $\text{MeReO}_3$  en líquidos iónicos (esquema 4).



ESQUEMA N°4: Oxidación de aminas (13).

#### 1.4.3. Condensación de aldehídos con N-alkil o N-arilhidroxilaminas

Los compuestos tipo nitrona también puede ser preparados por la reacción de condensación de N-alkil o N-aril hidroxilaminas con compuestos carbonílicos alifáticos, aromáticos o heteroaromáticos, principalmente aldehídos. Sin embargo, este método

posee algunas desventajas tales como: la disponibilidad limitada de hidroxilaminas las cuales no son abundantes en el mercado farmacéutico.

Se demostró que en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente, en presencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y trimetilamina, forma una reacción irreversible, una vez el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  saturado con agua no era posible hidrolizar la nitrona. La velocidad de reacción dependía fuertemente de la estructura en la hidroxilamina y un mayor tiempo de reacción y condiciones más fuertes para las diferentes reacciones. La velocidad de reacción se ve más afectada por la presencia de sustituyentes de oxígeno como el peróxido o el hidroxilo (14).

## 2. INFLAMACIÓN

### 2.1. Concepto

La palabra inflamación deriva de la palabra en latín *inflammare*, cuyo significado es «prender o encender fuego» (15). El cirujano escocés Hunter, destacó un aspecto que en la actualidad es considerado obvio y común en este proceso: “La inflamación no es una enfermedad, sino una respuesta inespecífica que produce el cuerpo, siendo este un efecto saludable para el organismo en que tiene lugar”, No obstante, el primer científico en estudiar y describir los cuatro signos cardinales de la inflamación fue Celsius (escritor romano del siglo I d.c.). Años después Virchow añadió el quinto signo clínico; actualmente se pueden reconocer /los cinco signos cardinales de la inflamación los cuales son: rubor, tumor, calor, dolor e impotencia funcional (signos de Virchow) (16).

### 2.2. Características generales

La inflamación es la respuesta de los tejidos vivos vascularizados a los diferentes tipos de lesión. Puede ser causada por infecciones microbianas (bacterias gram + y gram -), agentes físicos o químicos (venenos de animales, objetos o cuerpos extraños), tejido necrótico o reacciones de tipo inmunitario (causadas por enfermedades autoinmunes y reacciones alérgicas entre otras). La inflamación cumple con el objetivo de contener y aislar la lesión para evitar la propagación de la misma a otros tejidos sanos, a su vez tiene la finalidad de destruir microorganismos invasores e inactivar toxinas, el tejido, preparando el tejido o la parte dañada para la cicatrización y reparación. Aunque es fundamentalmente una respuesta protectora del organismo, la inflamación en algunos casos también puede ser nociva; puede causar reacciones de hipersensibilidad graves o una lesión orgánica inexorable y progresiva producida por una inflamación crónica

seguida de una posterior fibrosis (p.ej., artritis reumatoide, aterosclerosis) (17). La inflamación se caracteriza, generalmente, por:

- Dos componentes principales: una respuesta vascular y una respuesta inflamatoria mediada por células.
- Efectos que son mediados por proteínas circulantes en el plasma sanguíneo y por factores producidos localmente por las células de la pared vascular o inflamatorias (citocinas, interleucinas, compuestos químicos).
- Finalización que tiene lugar cuando es eliminado el agente agresor y son retirados los mediadores secretados; también están implicados en dicha respuesta los diferentes mecanismos antiinflamatorios activos (17).

### 2.3. Causas

Los agentes causantes de inflamación pueden ser los siguientes:

- Agentes infecciosos: como las bacterias en mayor parte las gram-, los virus y sus diferentes toxinas, hongos y los parásitos.
- Agentes inmunitarios: como las reacciones mediadas por células en enfermedades autoinmunes y reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.
- Agentes físicos: como el calor, frío, la radiación y los traumatismos mecánicos (golpes y lesiones por contacto físico).
- Agentes químicos: como venenos orgánicos presentes en seres vivos e inorgánicos presentes en compuestos químicos como ácidos entre otros.
- Materiales inertes: como cuerpos extraños (18).

### 2.4. Signos clínicos de la inflamación

Los signos característicos de la inflamación son:

- a) Calor: mediado por el aumento local de la temperatura, secundario a vasodilatación, y aumento de consumo local de oxígeno por los tejidos del cuerpo (19).
- b) Rubor: producido por el aumento de irrigación sanguínea en la zona afectada (19).
- c) Dolor: el cual es provocado por distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas como mediadores químicos de la inflamación (19).

- d) Edema: resultante del aumento de la permeabilidad capilar y consiguiente sufusión de líquido en el tejido intersticial después del daño ocasionado (19).

## 2.5. Diagnóstico

La inflamación en cualquier parte del cuerpo, provoca una liberación de diferentes sustancias las cuales son:

- **Homocisteína.**
- **TNF- $\alpha$ .**
- **IL-6.**
- **Proteína en suero electroforesis (PSE):** utilizada para confirmar la inflamación crónica. Mide ciertas proteínas en la parte líquida de la sangre. Una gran cantidad o muy poca cantidad de estas proteínas puede indicar inflamación y marcadores de otras afecciones, este diagnóstico no es 100% completo para determinar algún tipo de inflamación.
- **Proteína C reactiva (PCR):** la PCR es producida de manera natural en el hígado en respuesta a los diferentes tipos de inflamación. Un alto nivel de PCR en la sangre puede ocurrir debido a diferentes afecciones inflamatorias. Si bien esta prueba es muy sensible a la inflamación, no ayuda a diferenciar entre inflamación aguda y crónica, ya que la PCR se encuentra elevada durante ambas. Los niveles altos combinados con ciertos síntomas pueden ayudar a hacer un buen diagnóstico.
- **Velocidad de sedimentación globular (VSG):** esta prueba mide indirectamente la inflamación al medir la velocidad a la que los glóbulos rojos se hunden en un tubo de sangre. Cuanto más rápido se hundan, más probable es que se experimente inflamación. No obstante, esta prueba rara vez se solicita, ya que no ayuda a identificar causas específicas de inflamación (20).

## 2.6. Clasificación de la inflamación

La clasificación de la inflamación se realiza tomando en cuenta el tiempo de duración, por el carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización.

- **Por la duración, pueden ser:**
  - a) Agudas: Este tipo de inflamación es una respuesta inmediata al agente agresor, cuya finalidad es la liberación de mediadores para la defensa del organismo en el área de la lesión cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta hasta la eliminación del agente agresor (22).
  - b) Crónicas: Es un proceso de larga duración, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa en el lugar de la lesión y un repetitivo intento de reparación del cuerpo, la cual la mayoría de veces es fallida o nula (21).
- **Por el carácter del exudado, pueden ser:**
  - a) Trasudado: caracterizado por la aparición de líquido extravascular con bajo contenido proteico, el cual es producto de un ligero cambio en la permeabilidad vascular.
  - b) Exudado: presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, lo cual muestra una permeabilidad muy elevada en los diferentes vasos sanguíneos (21).
- **Por la etiología, pueden ser:**
  - a) Infecciosas: mediado por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas.
  - b) Traumáticas: ocasionada por golpes intensos la cual tiene una respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces o higromas.
  - c) Térmicas: resultantes de quemaduras por calor o congelamiento.
  - d) Irradiaciones.
  - e) Por exposición a agentes químicos ambientales (23).
- **Por sus características morfológicas, pueden ser:**
  - a) Serosa: mediado por la acumulación de líquido tisular de bajo contenido proteico.
  - b) Fibrinosa: presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno.

- c) Supurativa o purulenta: caracterizado por la producción de exudados purulentos que consta de leucocitos y células necróticas.
  - d) Abscesos: presenta tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva.
  - e) Úlceras: producidas por esfacelamiento de tejido necrótico inflamado (21).
- **Por su localización, se dividen en:**
    - a) Focales: producidas en zonas y órganos específicos, en cuyo caso se utiliza el sufijo -itis, por ejemplo, faringitis, otitis, laringitis, conjuntivitis, peritonitis.
    - b) Diseminados: es resultado de la propagación de procesos inflamatorios los cuales son persistentes ya sea por vía canalicular, fistulización o metástasis (21).

## 2.7. Fisiopatología de la inflamación

Diferentes tipos de agresión local a un organismo desencadena respuestas en diversas fases, cuya finalidad es el aumento de flujo sanguíneo el cual es dirigido hacia la zona donde se produjo el daño, a su vez facilita la migración y activación de células inflamatorias con el fin de combatir así el proceso lesivo. Estas fases son:

### 2.7.1. Cambios Vasculares

Este es el primer proceso inflamatorio el cual tiene como finalidad maximizar el traslado de los leucocitos al sitio de la lesión. Inicia con una dilatación arteriolar y capilar que va precedida por un espasmo el cual es transitorio de un tiempo aproximado de 3 a 5 segundos, dicha dilatación es explicada por la aparición de un eritema y aumento de temperatura en el sitio lesionado, esta dilatación vascular es regulada por mediadores químicos, como la histamina y el ácido nítrico siendo estos los principales mediadores (24).

### 2.7.2. Cambios celulares

Caracterizado por el paso de leucocitos a la periferia este proceso es conocido como (marginación) a partir de los vasos sanguíneos, hasta su llegada al tejido. Los siguientes pasos principales:

### **2.7.2.1. Marginación**

Este proceso inicia con la disminución en la velocidad de los leucocitos y al agrupamiento de los mismos en la mitad de los vasos sanguíneos (estasis), dejando a los leucocitos en la periferia o en la pared vascular, este fenómeno es conocido como marginación (25).

### **2.7.2.2. Rodadura**

Se caracteriza por la adhesión transitoria de los leucocitos al endotelio vascular, esto facilita la agregación de células nucleadas. Esto principalmente se debe gracias a las moléculas de adhesión conocidas como selectinas, se encuentran en las células del endotelio, las cuales se unen a su ligando o receptor en el leucocito (25).

### **2.7.2.3. Adhesión**

Una vez que los leucocitos superaron la fase de rodadura se unen al endotelio vascular a través de moléculas de adhesión vascular de la familia de las inmunoglobulinas denominadas ICAM-1 y VCAM-1 por medio de glucoproteínas transmembrana conocidas como integrinas (en el leucocito). (25).

### **2.7.2.4. Transmigración o diapédesis**

Se describe con este término la migración de los leucocitos a través de las células endoteliales asistidas por moléculas de adhesión modificadas, la principal es la PECAM o CD 31 (25).

### **2.7.2.5. Quimiotaxis**

Este proceso es ocasionado cuando las células nucleadas salen de los vasos sanguíneos, después de este proceso deben dirigirse al tejido lesionado o agredido a través de sustancias y mediadores químicos que sirven de “guía” para las células encargadas de la respuesta. Las sustancias químico y mediadores químicos pueden ser propias del organismo, como las citocinas, productos del metabolismo del ácido araquidónico, factores del complemento o de patógenos externos como ciertas sustancias conformacionales de las bacterias. Una vez que los linfocitos llegan al sitio de la lesión gracias al proceso de quimiotaxis, su trabajo es reconocer mediante sus receptores de membrana las estructuras celulares de microbios, complejos inmunes y citosinas

específicas para que, por medio de interacciones moleculares, los linfocitos se activen. Este proceso conlleva una serie de eventos en cadena que se inician en la membrana celular, prosiguen en el citoplasma y terminan en el núcleo.

La activación de los leucocitos da comienzo cuando los distintos tipos de receptores reconocen tanto componentes de los microorganismos como moléculas y complejos inmunes. Una vez activados los leucocitos, su función es producir sustancias citosinadas (reguladores y amplificadores de la respuesta inmune) o factores citotóxicos (productos del metabolismo del ácido araquidónico y vaciamiento de enzimas lisosomales) (25).

#### **2.7.2.6. Fagocitosis**

Una vez que los leucocitos llegan al sitio de mayor concentración de factores quimiotácticos, como ya se mencionó, el proceso siguiente es la activación, la cual da inicio con la identificación del agente, partícula extraña o microorganismo con el fin de ser eliminado o fagocitado.

Aunque la inflamación es un fenómeno biológico el cual es adquirido durante la evolución, su propósito es eliminar o limitar el daño y finalmente repararlo. El proceso de reparación puede dar inicio dentro de las primeras 24 h de ocurrido el daño, cuando los macrófagos empiezan a cumplir con su función de “limpieza” al digerir los restos celulares, bacterias, tejido necrótico. Al mismo tiempo, se inicia la proliferación de células endoteliales y fibroblastos que van a formar vasos nuevos mediante estímulos de angiogénesis para tratar de restaurar la circulación y depositar colágeno y proteoglicanos para reparar el intersticio. (25).

### **2.8. Amplificación de la respuesta inflamatoria**

#### **2.8.1. Sistema inmunitario innato**

El sistema inmunitario innato es el encargado de la respuesta inicial a la invasión de tejido por cuerpos extraños. Las fases citadas anteriormente de vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular e infiltración celular son parte de la respuesta inmune innata. Los componentes celulares primarios de este sistema son los macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales y neutrófilos. Además de estos componentes celulares, las proteínas efectoras circulantes como el sistema de

complemento, los reactantes de fase aguda y la cascada de la coagulación juegan un papel importante en la inmunidad innata (26).

La actividad de las diferentes citocinas y mediadores de la inflamación determina en gran medida la magnitud de la respuesta innata frente a la inflamación. Las citocinas son polipéptidos los cuales son elaborados por las células del sistema inmune en respuesta a los diferentes tipos de infecciones o a su vez la lesión tisular. Estos sirven para regular las reacciones inmunitarias e inflamatorias. La producción de citocinas es generalmente autolimitada, aunque algunas citocinas pueden seguir estando presentes en la circulación por largos períodos de tiempo. También existe redundancia entre citocinas. Los ejemplos más conocidos son TNF- $\alpha$  e IL-1. Ambas citocinas tienen la capacidad de inducir fiebre, estimular la producción de proteínas de la fase aguda por el hígado y causar la activación de células endoteliales (27).

## **2.8.2. Sistema inmunitario adquirido**

La respuesta inmune innata también sirve para la activación y amplificación de la inmunidad adquirida. Este proceso es mediado principalmente por la IL-12. La respuesta inmune adaptativa es inducida principalmente por la exposición de antígenos extraños a las células T CD4 y T CD8. La activación de estas células provoca un aumento en la producción de citocinas y a su vez amplifica los sistemas tanto innato como adquirido. La citocina primaria producida por las células T es el IFN $\gamma$ . El IFN $\gamma$  amplifica la respuesta proinflamatoria la cual causa la activación de los macrófagos, estimulando las funciones citolíticas de las células T CD8 (28).

## **2.9. Mediadores químicos de la inflamación**

### **2.9.1. Sistema de complemento**

Este sistema este compuesto por una secuencia de señales en cascada de proteínas séricas, este comprende más de 20 componentes; el producto resultante de la activación es una proteína activa. Las proteínas que forman parte del complemento realizan múltiples tareas en la respuesta del organismo frente a la infección. Este sistema puede ser activado de cuatro formas durante la respuesta inflamatoria aguda:

- a) Las células necróticas liberan enzimas las cuales son capaces de activar el complemento.

- b) Los complejos antígeno-anticuerpo activan el complemento por la vía clásica.
- c) Las endotoxinas de las bacterias gram negativas activan el complemento por la vía alterna.
- d) Los productos de los sistemas fibrinolítico y de las quininas activan el complemento (29).

### 2.9.2. Aminas vasoactivas

- **Histamina:** Esta sustancia es el mediador de la fase aguda y se encuentra almacenada en gránulos de células cebadas, basófilos y plaquetas. La histamina es secretada en respuesta a lesiones de tipo físico, como los traumatismos, el frío o el calor; o ante la presencia de agentes inflamatorios como son moléculas del complemento (C3a, C5a), proteínas lisosomales e interleucinas (IL).
- **Serotonina:** Es una amina vasoactiva que se encuentra presente en las plaquetas, se activa cuando las plaquetas entran en contacto con el colágeno y la trombina (30).

### 2.9.3. Metabolitos del ácido araquidónico

Los niveles intracelulares de ácido araquidónico libre son muy bajos en el organismo, debido a eso las células deben implementar un mecanismo enzimático que le permita disponer de él, como sustrato para la producción de eicosanoides.

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, derivado del ácido linoleico, se encuentra en la dieta o también incorporado a la fosfatidilcolina o fosfatidilinositol, fosfolípidos estructurales que forman parte de las membranas plasmáticas de todas las células. El ácido araquidónico es liberado por acción de las fosfolipasas (pueden ser estimuladas por diversos factores como mecánicos, químicos y físicos). Una vez liberado, puede metabolizarse por dos vías (31):

- a) Vía de las ciclooxigenasas (la forma constitutiva COX-1 y la inducible COX-2) generan intermediarios que, después de ser procesados por diferentes enzimas de función específica, producen prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>) producido por mastocitos, (PGE<sub>2</sub>) elaborado por macrófagos, células endoteliales y los tromboxanos (TXA<sub>2</sub>, siendo el principal metabolito del ácido araquidónico generado por las

plaquetas); el endotelio vascular carece de tromboxano sintetasa, pero posee una prostaciclina sintetasa, y, por tanto, genera prostaciclina (PGI<sub>2</sub>).

- b) El segundo camino que puede seguir el ácido araquidónico es el de las lipooxigenasas; aquel es transformado en una serie de ácidos peroxidados que corresponden a los leucotrienos y las lipoxinas (31).

Los eicosanoides son derivados del ácido araquidónico que cumplen una función como intracelulares o extracelulares en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la hemostasis. Sus efectos principales son:

- Prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>): Vasodilatación, dolor y fiebre.
- Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>): Vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria.
- Tromboxanos (TXA<sub>2</sub>): Vasoconstricción y activación de la agregación plaquetaria.
- Leucotrienos: LTB<sub>4</sub> es un mediador quimiotáctico y activador de los neutrófilos; los otros leucotrienos son vasoconstrictores, inducen el broncoespasmo y aumentan la permeabilidad vascular (más potentes que la histamina).
- Lipoxinas: Vasodilatación, inhibición de la adhesión de los neutrófilos; estos metabolitos son encargados en el proceso de disminución de la inflamación, por lo que intervienen en la detención de la misma; a diferencia de los demás derivados, necesitan dos tipos celulares para ser sintetizados: los neutrófilos que producen intermediarios de la síntesis, que son convertidos en lipoxinas por las plaquetas al interactuar con los neutrófilos (31).

#### 2.9.4. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es uno de los más potentes vasodilatadores que se libera a partir de células endoteliales y macrófagos. Este es producido por la acción de la sintasa del óxido nítrico sobre la L-arginina. El NO se comporta como un regulador de la inflamación, reduciendo de forma activa los efectos de otros mediadores proinflamatorios (32).

### **3. LIPOPOLISACÁRIDO**

#### **3.1. Concepto**

Desde los tiempos de Hipócrates (460-370 a. C.) y Galeno (129-199 a. C.) se propuso que las diferentes enfermedades eran producidas por venenos o miasma este término proviene del griego miainein; la cual indicaba que el “mal aire” esparcía el veneno y las personas que lo inhalaban se enfermaban. Otra teoría explicada por el científico Jacob Henle (1809-1885) postuló que el veneno pútrido, venenoso no volátil conocido como “miasma” o “contagión” cuyo término proviene del latín ‘contigiere’, podía reproducirse en los diferentes individuos afectados haciendo alusión a organismos vivos que entraban en contacto con los seres vivos (33).

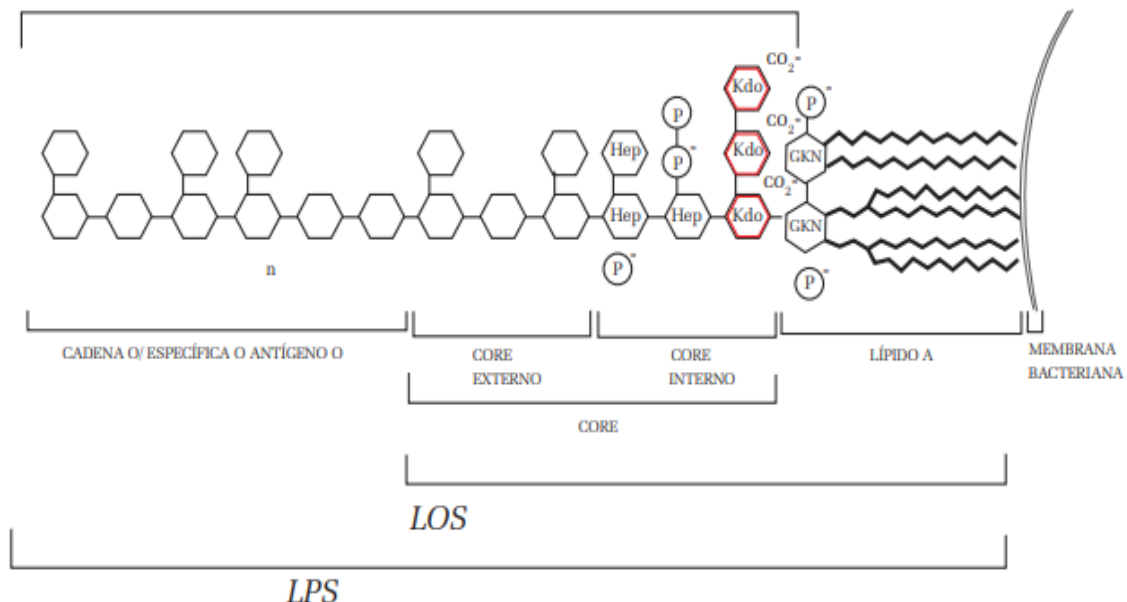
El pensamiento de que un veneno podría estar presente en la materia en descomposición tomó sustento con los experimentos realizados por Albrecht Von Haller (1708- 1777) y François Magendie (1783-1855). Peter L. Panum (1820-1885), quien extraía sustancias de materia orgánica en descomposición, reportó una sustancia la cual era resistente al calor, no volátil, soluble en agua y con una característica poco común la cual era la capacidad de inducir fiebre. Louis Pasteur (1822-1895) demostró que los gérmenes eran los responsables de la putrefacción y descomposición de todo tipo de materia de origen orgánico. Ludwig Brieger (1849-1919) descubrió que los gérmenes producen y secretan productos venenosos a los cuales denominó toxinas. Las toxinas diftérica y tetánica, fueron las primeras sustancias de origen bacteriano identificadas, años más tarde Robert Koch con ayuda del desarrollo de las primeras técnicas de cultivo bacteriano, demostró que las bacterias que crecían, eran capaces de generar sepsis en animales a los que se les inoculaba dichas bacterias. Entre 1930 y 1940, gracias al avance en técnicas bacteriológicas, fue posible discernir las primeras características químicas de esta sustancia, lográndose identificar 2 porciones una porción de carácter lipídico y una glicosídica, motivo por el cual se le atribuyó el nombre de Lipopolisacárido (LPS). Años más tarde se establecería que el LPS es parte de la segunda membrana de las bacterias Gram negativas y que no se encuentra en la pared celular de las bacterias Gram positivas (34).

#### **3.2. Estructura del lipopolisacárido**

El LPS compone entre un 10-15% del total de las moléculas que se encuentran presentes en la membrana externa y ocupa un 75% de la superficie de la bacteria. Esta molécula es de naturaleza anfifílica que tiene una composición que tiene variaciones intra

e inter especie. Esta molécula está compuesta por dos regiones, principalmente un glucolípido el cual recibe el nombre de lípido A y un heteropolisacárido el cual es el núcleo o core, estas dos regiones están unidas entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO). El lípido A es conocido como la fracción biológicamente activa que posee la molécula, este es un disacárido (glucosamina) el cual está unido a ácidos grasos que por lo general son el ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertos en la membrana externa de la bacteria (35).

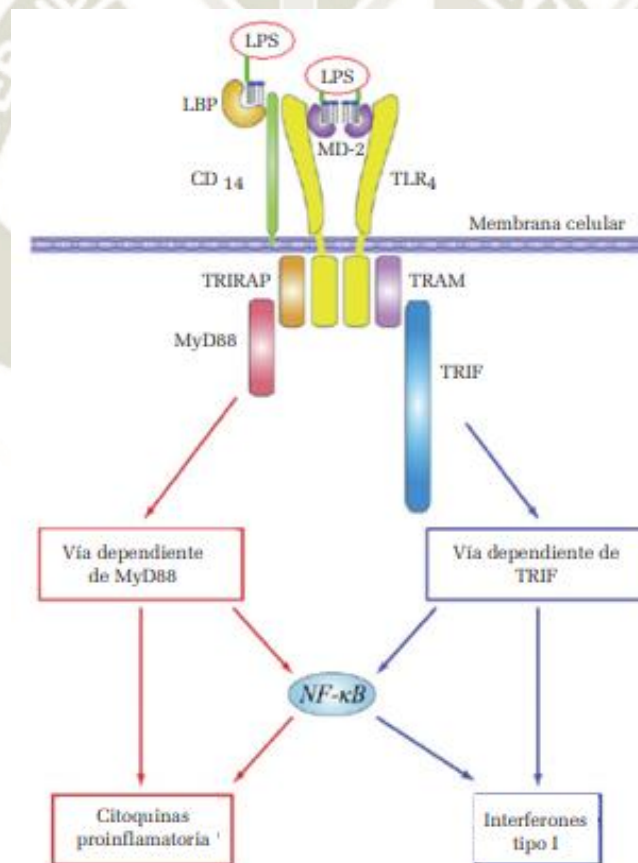
El core está subdividido en dos partes las cuales son el core externo (formado por hexosas) y en core interno (formado por heptosas). En algunos microorganismos el LPS tiene una región sacárida adicional la cual es conocida como antígeno O, este antígeno es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos altamente variable entre especies bacterianas. Dada esta variabilidad entre los componentes se designa al LPS como lipopolisacárido (LPS) cuando presenta las fracciones lipídicas, core y antígeno O, y como lipooligosacárido (LOS) cuando presenta únicamente las fracciones lipídicas y core, al LPS además se le conoce con el nombre de LPS liso debido a que cuando se le siembre en agar gel, sus colonias crecen con bastantes bordes lisos y LPS rugoso a las colonias que crecen con borde irregular las cuales poseen una apariencia rugosa (Figura 3).



**FIGURA N°3:** Estructura general del LPS (36).

### 3.3. Función del lipopolisacárido

Cuando el LPS es liberado a partir de la membrana de la bacteria como consecuencia de la multiplicación o lisis de la misma, entra en contacto con diferentes proteínas que posee el hospedero, dentro de las que se destacan la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores CD14, TLR4 y MD-2. La proteína LBP cumple la función de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando, de esta manera, la unión del LPS con el receptor CD14, el CD14 es una glicoproteína soluble o anclada a la superficie celular de monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales, esta glicoproteína no posee dominio intracitoplasmático y tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2). La MD-2 es una proteína soluble asociada con el receptor TLR4 (receptor toll o receptor de proteína transmembrana) para llevar a cabo la transducción del LPS.



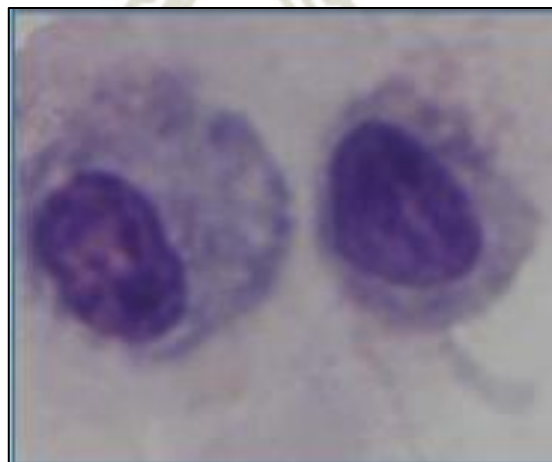
**FIGURA N°4:** Reconocimiento y vías de transducción del LPS (37).

Una vez formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR4 sufre una reacción la cual es llamada oligomerización, esta inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen dominios TIR (Receptores Toll de Interleuquina 1),

las cuales cumplen la función de mediar y controlar la relación entre el TLR4 y las proteínas celulares de transducción del LPS; existen cinco proteínas celulares utilizadas por el TLR4 que contienen dominios TIR (MyD88: proteína de diferenciación mieloide; TIRAP: proteína adaptadora del dominio TIR; TRIF: proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón  $\beta$ ; TRAM: molécula adaptadora relacionada con el TRIF y SARM: proteína inhibidora de la señal del TRIF) (Figura 4).

#### 4. MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células que forman parte del sistema inmune, las cuales están especializadas en la detección, fagocitosis y destrucción de bacterias y otros organismos dañinos los cuales son extraños al organismo. Además, los macrófagos pueden presentar antígenos a las células esto dará inicio al proceso inflamatorio, mediante la liberación de citocinas, que activan otras células. Los macrófagos son producidos a partir de monocitos sanguíneos que dejan la circulación para diferenciarse en distintos tejidos. Cada conjunto de macrófagos es substancialmente heterogéneo, lo que probablemente refleja el grado de especialización requerido dentro del ambiente tisular en el que se encuentren. Dicha diferencia entre macrófagos se ve reflejada principalmente en su morfología, el tipo de patógenos que pueden ser capaces de reconocer y finalmente el nivel de citocinas inflamatoria que pueden llegar a producir (ej. IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa). Además, los macrófagos producen especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico, que permite la destrucción de las diferentes bacterias que han sido fagocitadas. La naturaleza heterogénea de estas células no se deriva únicamente del proceso de diferenciación, sino que podría deberse en parte a los monocitos de los que se derivan (38).



**FIGURA N°5:** Macrófagos teñidos con tinción de Wright-Giemsa (38).

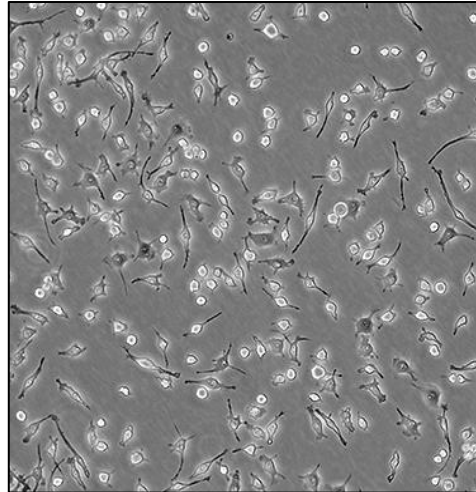
Los macrófagos pueden migrar y a su vez circular entre casi todos los tejidos del cuerpo humano, con la finalidad de encontrar patógenos y eliminar células muertas. La siguiente tabla describe la localización y función de unas cuantas poblaciones de macrófagos (Tabla 1).

**TABLA N°1:** Localización y función de macrófagos (39).

<b>Tipos de macrófagos</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
Macrófago alveolar	Alveolo pulmonar	Fagocitosis de células muertas o bacterias. Inicio y control de la inmunidad frente a patógenos.
Células de Kupffer	Hígado	Inician respuestas inmunitarias y remodelación del tejido hepático (reparación).
Microglía	Sistema nervioso central	Destrucción de neuronas viejas o muertas y control de la inmunidad en el cerebro.
Macrófagos del bazo	Zona marginal del bazo	Eliminación de glóbulos rojos disfuncionales

#### 4.1. Células RAW

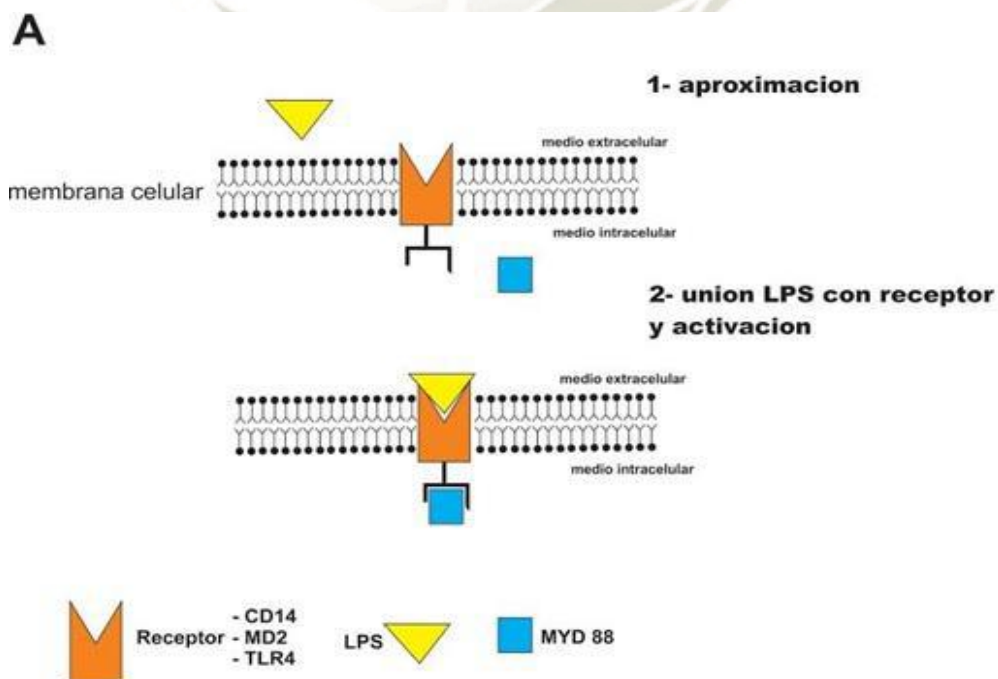
Estas células derivan de la línea celular monocito/macrófago RAW 264.7 la cual fue obtenida primeramente por el Dr. Peter Ralph, la cual necesita la presencia LPS para producir óxido nítrico (NO), ya que el tratamiento con IFN- $\gamma$  no es suficiente. Esta propiedad hace que el comportamiento celular sea más parecido a los macrófagos normales procedentes de diferentes cepas de ratón como por ejemplo C<sub>3</sub>H/HeN. Las células RAW 264.7 son las encargadas de la producción de nitritos por acción del óxido nítrico y los radicales libres (40).



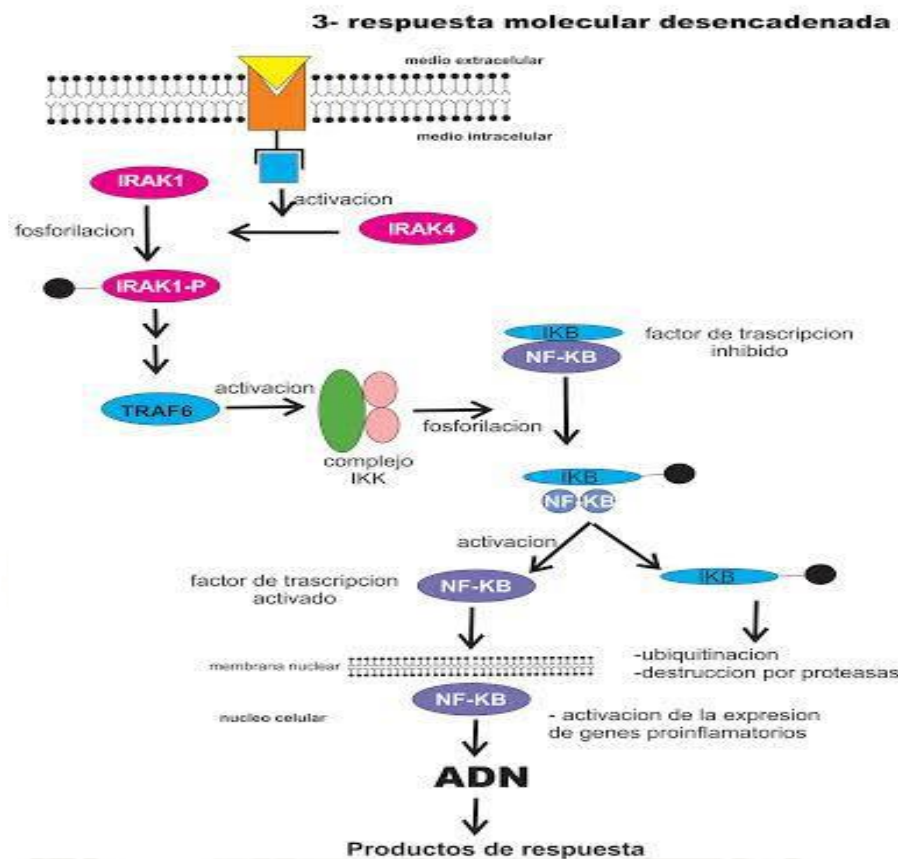
**FIGURA N°6:** Células RAW 264.7, 100x (40).

#### 4.2. Mecanismo de activación del macrófago por lipopolisacárido

El LPS al ingresar al organismo se une a un complejo receptor, del cual forma parte un miembro de la familia de los receptores tipo Toll, el TLR4, el cual está presente en la membrana celular de los macrófagos tipo m1 los cuales son de origen inflamatorio. La unión de LPS al complejo receptor en la membrana celular del macrófago produce el inicio de una cascada de señalización intracelular la cual tiene como finalidad activar y translocar al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (interruptor clave en el proceso inflamatorio), previamente retenido en el citoplasma gracias a la unión con su inhibidor (41).



**B**



**FIGURA N°7: A-** Unión del LPS al complejo receptor. **B-** Cascada intracelular activada por la unión del LPS al receptor (41).

## 5. Factor de transcripción nuclear *kappa beta*

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) fue estudiado e investigado por primera vez en 1986 en el laboratorio de D. Baltimore, donde se pudo observar que actuaba como modulador de la transcripción de la cadena ligera de las inmunoglobulinas en los linfocitos B. Estudios posteriores demostraron que NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción nuclear dimérico el cual está implicado en la regulación de diversos procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis (42).

### 5.1. Características de NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es el encargado de la regulación de diferentes procesos fisiológicos, como lo es el desarrollo de la respuesta inmune, innata como adaptativa, la hematopoyesis y la oncogénesis entre otros procesos. Normalmente el NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo en el citosol, unido a alguno de los miembros de las proteínas

inhibidoras I $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B puede tener lugar a través de tres mecanismos de señalización (42).

En general, el NF- $\kappa$ B puede ser activado en pocos minutos por una gran variedad de factores como citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, factores involucrados en la señalización de células T entre otros. Los genes regulados por el NF- $\kappa$ B incluyen los que codifican para interleucina (IL) 2, IL6, IL8, el receptor de IL2, la subunidad IL12 p40, VCAM1, ICAM1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y el c-Myc. Actualmente, el NF- $\kappa$ B ha sido ligado a un sinnúmero de enfermedades metabólicas, inflamatorias y diversos tipos de cáncer. Entre las enfermedades humanas más importantes y más estudiadas se encuentran el asma, la diabetes, la gastritis asociada a *Helicobacter pylori*, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica y la enfermedad inflamatoria intestinal (43).

## 6. Familia de factores NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es un dímero constituido por proteínas pertenecientes a la familia Rel. Los miembros de esta familia cumplen la función de activar la transcripción de los genes diana de la vía, estos pueden clasificarse en dos subfamilias:

- **Subfamilia I:** Incluye los miembros con dominio TAD los cuales son RelA, c-Rel y RelB.
- **Subfamilia II:** Incluye los miembros sin dominio TAD como NF- $\kappa$ B (p50) y NF- $\kappa$ B (p52) (44).

### 6.1. Señalización por la vía NF- $\kappa$ B

Se han descrito tres mecanismos distintos de la activación de la vía NF- $\kappa$ B los cuales son la vía canónica, la vía no-canónica y la vía atípica

#### 6.1.1. Vía canónica de la activación de NF- $\kappa$ B

La vía canónica o vía clásica es la forma más común que tiene el NF- $\kappa$ B de ser activado en todos los tipos celulares. Está relacionada con la activación de dímeros compuestos por Rel A o c-Rel y el p50. La vía canónica es activada en respuesta a citoquinas NF- $\kappa$ B proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, a la deprivación de glucosa, estrés oxidativo y en gran parte a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

La activación de esta vía es dependiente de la fosforilación de las quinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  en los residuos de Ser181 y Ser 180, respectivamente. El complejo IKK activo se encarga de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en las Ser32 y Ser36 marcándolas así para su

poliubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma 26S. A su vez, la activación de  $IKK\alpha$  e  $IKK\beta$  provoca fosforilación de p105, el cual, tras un proceso proteolítico da lugar a la forma madura la cual es la p50. Las dos quinasas  $IKK\alpha$  e  $IKK\beta$  no tienen la misma importancia en la activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B. La  $IKK\beta$  se ha descrito como la quinasa predominante en la fosforilación del  $I\kappa$ B $\alpha$  y del p105 (Figura 8).

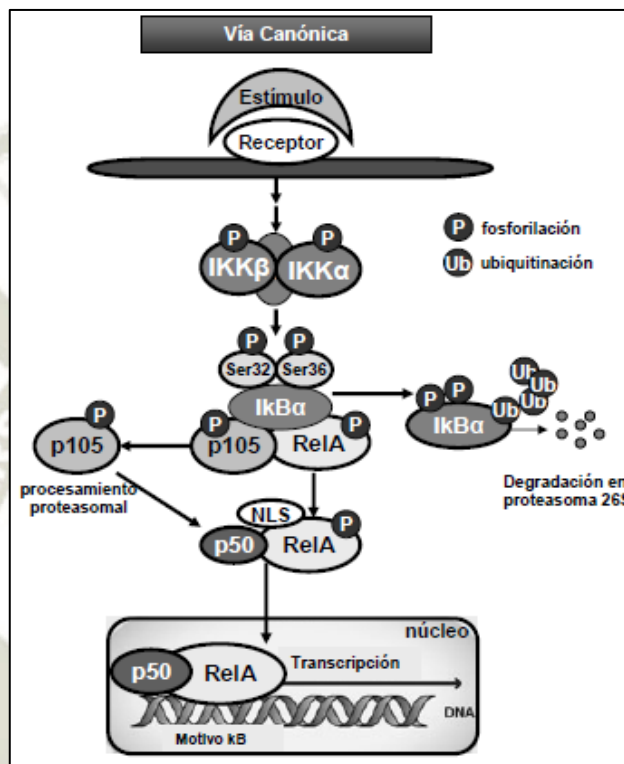


FIGURA N°8: Activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B (45).

### 6.1.2. Vía no canónica de la activación de NF- $\kappa$ B

La vía no canónica o conocida como  $I\kappa$ B independiente. Es caracterizada por la activación del heterodímero RelB/p52. La activación de esta vía tiene relación directa con un número limitado de estímulos que incluye la linfotoxina B, el ligando de CD40 y el factor de activación de las células  $\beta$ . La activación de la vía no canónica es dependiente de la activación de homodímeros  $IKK\alpha$  a través de una quinasa llamada inductor NF- $\kappa$ B de quinasa, esta es la encargada de la fosforilación de  $IKK\alpha$  la cual por su parte tiene la responsabilidad de fosforilar p100, que tras el procesamiento en el proteosoma da lugar a la forma activa, p52. La forma madura de p52 se une a RelB provocando su translocación nuclear y la respuesta génica (figura 9).

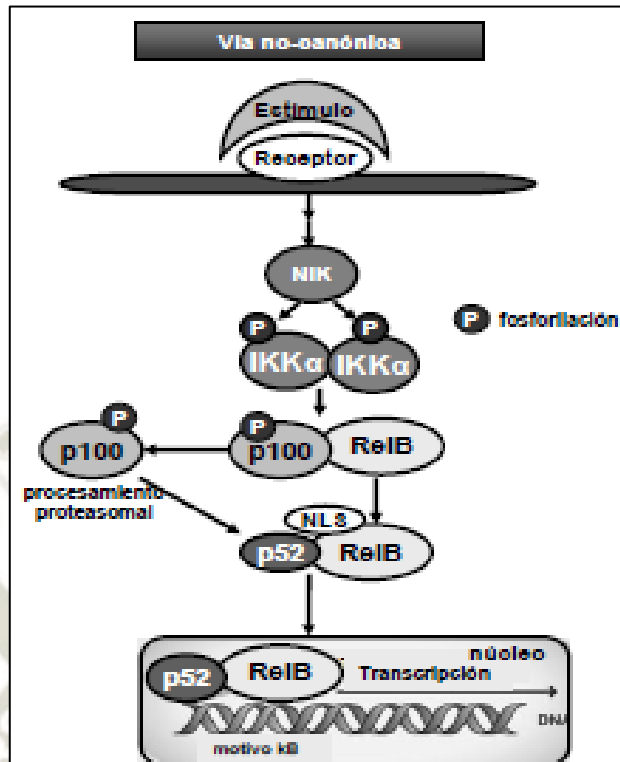


FIGURA N°9: Activación de la vía no canónica de NF-κβ (46).

### 6.1.3. Vía atípica de la activación de NF-κβ

La activación de esta vía tiene relación con la regulación IKK independiente de NF-κβ y está caracterizada por la fosforilación de Iκβα en Tyr42 y a su vez en la activación del RelA/p50. Una vez fosforilado, Iκβα se separa del heterodímero RelA/p50, lo que permite que el complejo NF-κβ entre en el (Figura 10).

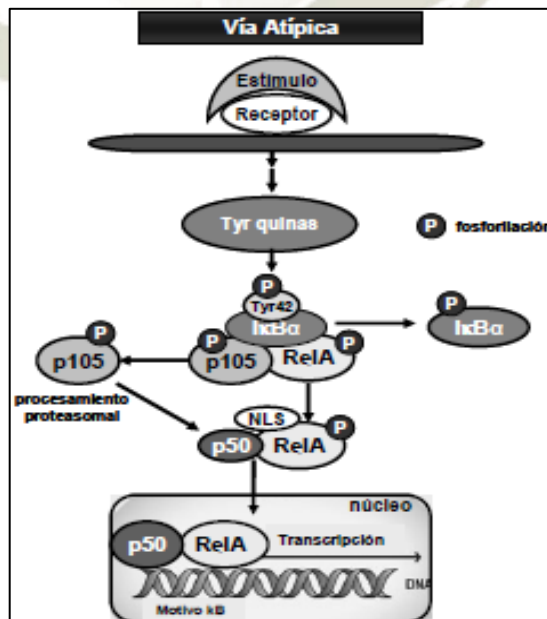


FIGURA N°10: Activación de la atípica de NF-κβ (47).

#### 6.1.4. Genes regulados por NF- $\kappa$ B

Los receptores tipo toll (TLR) son receptores transmembrana de tipo 1 estos receptores presentan homología con la proteína *toll* de *Drosophila* y el receptor de la il-1 (il-1r). En la actualidad se sabe que existen 11 tlr en humanos y 13 en ratones, con un amplio rango de ligandos que incluyen estructuras presentes en bacterias, hongos y parásitos. Luego de la formación del complejo receptor de LPS conformado por 2 receptores tlr-4 dimerizados y 2 moléculas del adaptador md-2 seguido de la traducción de la señal a través de 2 posibles mecanismos: dependiente de myd88 (más rápida y temprana utilizando adaptadores como mal) e independiente de myd88 (de manera tardía utilizando factores como trif y tram).

El receptor tlr-4, se encuentra ubicado en la membrana de células liberadas por el sistema inmune, está compuesto por 3 grandes dominios: el dominio extracelular rico en leucinas encargado del reconocimiento y marcación del ligando; el dominio transmembrana y el dominio intracelular tir encargado de la traducción de la señal (48).

Nf- $\kappa$ b permite la activación de diferentes genes, los productos de estos genes son citocinas proinflamatorias como INF- $\gamma$ , interleuquinas (il-1, il-1 $\beta$ , il-6, il-8, il-12) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (48).

#### 6.1.5. Efectos de los productos génicos activados por NF- $\kappa$ B

Las citocinas inflamatorias, las cuales son producidas por los macrófagos activados cerca del sitio de infección, promocionan la inflamación, incrementando significativamente la permeabilidad del endotelio vascular al plasma. Esto permite a los neutrófilos salir del sistema vascular por diapédesis y la liberación de péptidos antimicrobianos, mediadores lipídicos de la inflamación (leucotrienos), ROS y RNS por parte de estas células. (49).

Como hemos visto, NF- $\kappa$ B envía señales del estrés, pero a su vez activa la transcripción de ciertos genes que alivian esta condición; también ejerce funciones pro- y anti-apoptóticas dependiendo el tipo celular. La selectividad de NF- $\kappa$ B sobre sus genes objetivos, y por lo tanto el efecto celular que genera este factor de transcripción, reside en el tipo celular en el cual se activa, a partir de eso podemos observar diferentes mecanismos, entre ellos: distintas uniones o combinaciones de regiones (secuencias de ADN implicadas en el aumento de la expresión génica) y promotoras, así como

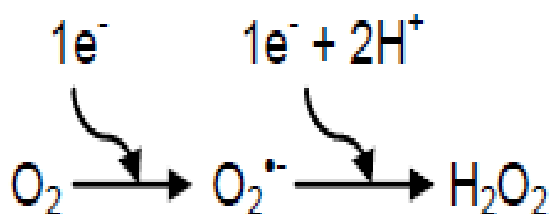
combinaciones de diferentes homo y heterodímeros, esto sucede entre los diferentes miembros de la familia NF- $\kappa$ B (50).

### 6.1.6. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, estos pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario; o a partir de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos (51).

#### 6.1.6.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La mitocondria es el principal productor de ROS esto sucede durante los procesos normales oxidativos del metabolismo, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que suceden en los complejos de transferencia de electrones, en la cadena respiratoria y que llevan al oxígeno como el último aceptor de electrones. Si un solo electrón se adiciona al oxígeno ( $O_2$ ), el producto obtenido será un radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido ( $O_2^{2-}$ ), el cual si es protona rápidamente en el ambiente celular para producir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Esquema 5).



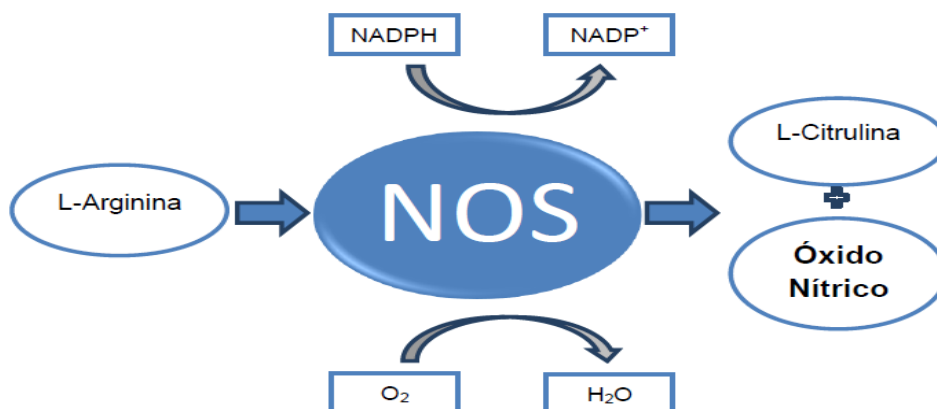
ESQUEMA N°5: Formación de especies reactivas de oxígeno (52).

#### 6.1.6.2. Producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS)

Dentro de las RNS, se encuentra el radical óxido de nitrógeno u óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$  o  $NO$ ), el cual es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y del oxígeno molecular, está reacción esta catalizada por el óxido nítrico sintetasa (NOS).

El aminoácido L-arginina es el sustrato inicial que se encarga de la producción de este radical. Los productos de la reacción son el  $NO^{\bullet}$  y la L-citrulina. La NOS utiliza cofactores NADPH y  $O_2$ , en la química de la reacción, la NOS primero hidroxila un nitrógeno guanidino terminal el cual le pertenece a la L-arginina para generar n-hidroxi-

L-arginina (NOHA), como intermediario unido a la enzima. NOHA es luego oxidado por la misma, dando como resultado NO y L-citrulina (esquema 6).



**ESQUEMA N°6:** Formación de especies reactivas de nitrógeno (53).

### 6.1.6.3. Efectos biológicos de las RNS

Los efectos del óxido nítrico pueden ser clasificados en directos o indirectos. Los efectos directos están dados por la reacción del  $\text{NO}^{\bullet}$  con ciertas moléculas blanco, produciendo reacciones conocidas como nitrosilaciones; estas son generalmente muy rápidas y las responsables de la mayoría de los efectos fisiológicos del  $\text{NO}^{\bullet}$ . Se efectúan cuando el óxido nítrico es producido en cantidades pequeñas por el óxido nítrico sintasas constitutivas ( $\text{NOS}_1$  y  $\text{NOS}_3$ ) para generar concentraciones nanomolares de  $\text{NO}^{\bullet}$  por períodos muy cortos de tiempo (54).

Los efectos indirectos se producen por la interacción de compuestos reactivos derivados del  $\text{NO}^{\bullet}$  (comúnmente óxidos de nitrógeno) con otras moléculas. Este tipo de efectos son notorios cuando el  $\text{NO}^{\bullet}$  es producido en cantidades grandes (generalmente por la iNOS), alcanzando concentraciones locales del orden de hasta  $10 \mu\text{M}$  por períodos prolongados. En estas condiciones, se propicia la formación de otros productos reactivos, producidos por interacción entre  $\text{NO}^{\bullet}$  y ROS, que participan en los procesos fisiopatológicos (54).

Cuando en el organismo existe exceso de radicales libres, cualquier estructura biológica que lo integra (ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos) puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y dar resultar dañada reversible como irreversiblemente. El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la

permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis o apoptosis (55).

El peroxinitrito es una RNS que es producido por la reacción del radical anión superóxido con el radical óxido nítrico.  $\text{ONOO}^-$  este radical puede reaccionar directamente con proteínas que contienen metales de transición centrales, como hemoglobina, mioglobina, citocromo c. El RNS puede cambiar la estructura de ciertas proteínas, a través de la oxidación de cisteína, afectando de esta manera, a la función de las estructuras biológicas (55).



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

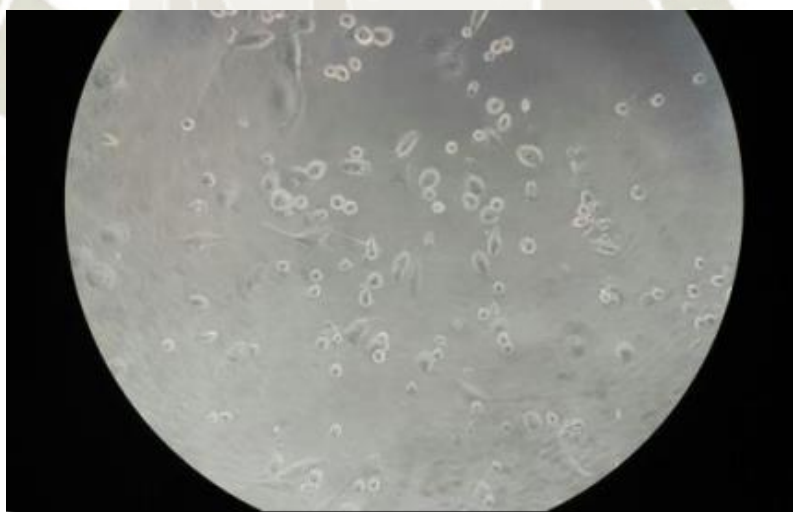
El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina.

#### 2. MATERIALES

##### 2.1. Material biológico

##### 2.1.1. Células RAW 264.7

Las células RAW 264.7 (Figura 11) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection localizada en ciudad sede del Condado de Montgomery en el estado de Maryland. Su almacenamiento y tratamiento se realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental en la Universidad Nacional de San Luis, ubicada en la provincia de San Luis en Argentina.



**FIGURA N°11:** Células RAW 264.7.

##### 2.1.2. Suero fetal bovino

El suero fetal bovino fue obtenido del laboratorio Natocor localizado en Villa Carlos Paz, provincia de Córdoba Argentina. Su almacenamiento y tratamiento se realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental en la Universidad Nacional de San Luis, ubicada en la provincia de San Luis en Argentina.

### 2.1.3. Lipopolisacárido bacteriano

El lipopolisacárido bacteriano fue obtenido de *Escherichia coli*, serotipo 055: B5, L2637, el proveedor fue el laboratorio Sigma-Aldrich® ubicado en la ciudad de San Luis en el estado de Misuri.

## 2.2. Material químico

### 2.2.1. Compuestos tipo nitrona

Los diferentes compuestos tipo nitrona (Anexo 1) fueron preparados en el laboratorio de química bioorgánica de la Universidad Federal de Río de Janeiro.

### 2.2.2. Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEN)

El medio de cultivo DMEN fue obtenido del laboratorio Sigma-Aldrich® ubicado en la ciudad de San Luis en el estado de Misuri.

## 2.3. Material de laboratorio

### 2.3.1. Material de vidrio

- Vaso de precipitados 50 mL y 100 mL
- Probetas 10 mL y 50 mL
- Pipetas 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Baguetas

### 2.3.2. Equipos de laboratorio

- Refrigerador (Sci-Cool)
- Congelador (Sci-Cool)
- Vortex (Mixer)
- Balanza analítica digital (RADWAG)
- Lector de placas (BioTek)
- Cabina de flujo laminar 2B (CRUMA)
- Estufa de cultivo CO<sub>2</sub> (Sanyo)
- Baño maría
- Lámpara de luz UV (MINERALIGHT®)

### 2.3.3. Reactivos y fármacos

- Agua destilada (Sigma-Aldrich®)
- Alcohol de 90° (Sigma-Aldrich®)
- Ácido fosfórico al 85% (Sigma-Aldrich®)
- Ácido fosfórico al 5% (Sigma-Aldrich®)
- Diclorhidrato de *N*- (1-naftil)-etilendiamina (Sigma-Aldrich®)
- Ácido sulfanílico (Sigma-Aldrich®)
- Nitrito de sodio, 97+%, A.C.S. (Sigma-Aldrich®)
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (Sigma-Aldrich®)
- Penicilina/estreptomicina

### 2.3.4. Otros materiales

- Guantes de nitrilo
- Papel aluminio
- Toallas pequeñas
- Gradilla de tubos Falcon 15 mL
- Gradilla de tubos Falcon 50 mL
- Gradilla para tubos Eppendorf
- Tubos Falcon 15 y 50 mL (Thermo Scientific)
- Tubos Eppendorf 1.5 y 2 mL (Thermo Scientific)
- Matraz de cultivo celular T75 (Thermo Scientific)
- Placa de cultivo celular 96 pocillos (Thermo Scientific)
- Placa para diluciones (Thermo Scientific)
- Espátula
- Micropipetas de 2-200 uL y 100-1000 uL (Capp)
- Micropipeta multicanal de 50-1000 uL (Capp)
- Tips 50, 100, 200 y 1000 uL
- Espátula para cultivo celular

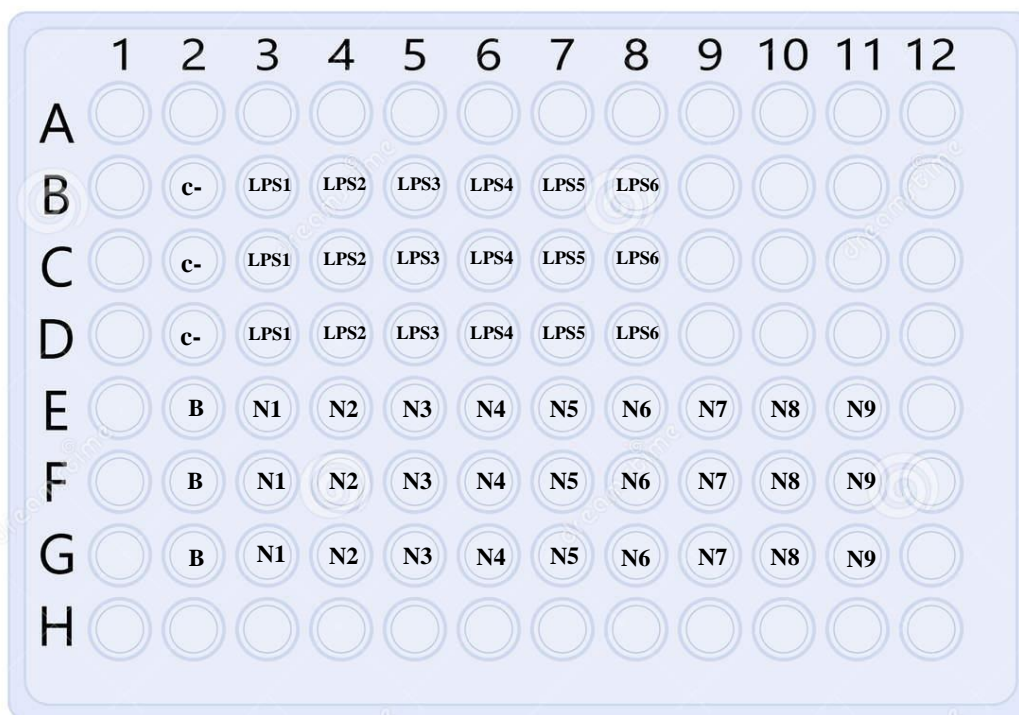
### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Diseño experimental

##### 3.1.1. Efecto del LPS y los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular

Se trabajaron con 4 grupos, los cuales fueron:

- **Grupo control negativo (c-):** Compuesto por células RAW 264.7 y medio completo.
- **Grupo blanco (B):** Compuesto por medio de cultivo.
- **Grupo lipopolisacárido (LPS):** Compuesto por células RAW 264.7, medio completo y lipopolisacárido, subdividido en 6 subgrupos, 0.5 (LPS1), 1 (LPS2), 5 (LPS3), 10 (LPS4), 50 (LPS5) y 100 (LPS6) ng/mL.
- **Grupos con tratamiento (N):** Compuesto por células RAW 264.7, medio completo y nitronas, subdividido en 9 subgrupos, los cuales recibieron nitronas diferentes al 5%, N1 (LQB-106), N2 (LQB-109), N3 (LQB-110), N4 (LQB-124), N5 (LQB-131), N6 (LQB-134), N7 (LQB-141), N8 (LQB-467), N9 (LQB-476).



**FIGURA N°12:** Placa de 96 pozos con la distribución usada para la evaluación del efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

### 3.1.2. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria

Se trabajaron con 5 grupos, los cuales fueron:

- **Control negativo (c-):** Compuesto por células RAW 264.7 y medio completo.
- **Control positivo (c+):** Compuesto por células RAW 264.7, medio completo y LPS 0.5, 1 y 5 ng/mL.
- **Grupo blanco (B):** Compuesto por medio de cultivo, el cual fue realizado en una placa aparte.
- **Grupo sin lipopolisacárido (CS):** Compuesto por células RAW 264.7 y compuestos tipo nitrona, subdividido en 9 grupos, que recibieron nitronas diferentes CS1 (LQB-106), CS2 (LBQ-109), CS3 (LBQ-110), CS4 (LBQ-124), CS5 (LBQ-131), CS6 (LBQ-134), CS7 (LBQ-141), CS8 (LBQ-467) y CS9 (LBQ-476).
- **Grupo con lipopolisacárido y tratamiento (C):** compuesto por células RAW 264.7, lipopolisacárido y compuestos tipo nitrona, subdividido en 9 grupos, los cuales recibieron diferentes nitronas al 5%. Se usaron tres placas diferentes debido a que se usó tres concentraciones diferentes de LPS 0.5, 1 y 5 ng/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C-	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9	
C		C-	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9	
D		C-	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9	
E		C+	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
F		C+	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
G		C+	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
H												

**FIGURA N°13:** Placa de 96 pozos con la distribución usada para evaluar la capacidad antiinflamatoria.

## **3.2. Preparación del medio de cultivo celular y cultivo de células RAW 264.7**

### **3.2.1. Fundamento**

El cultivo celular es un proceso mediante el cual se pueden cultivar células (procariotas, eucariotas o vegetales) en condiciones controladas. En la práctica, el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares, y especialmente de células animales. Los cultivos de células pueden definirse como en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas (56).

### **3.2.2. Preparación del medio de cultivo completo**

El medio de cultivo DMEN fue retirado del refrigerador y posteriormente fue puesto en baño maría por 3 minutos hasta alcanzar temperatura ambiente, así mismo el suero fetal bovino y la solución de penicilina/estreptomicina 1% fueron acondicionados de igual manera para evitar algún daño a las células por las bajas temperaturas. A continuación, se procedió a la preparación del medio completo al 20%, este medio será utilizado al descongelar las células para brindarle la mayor cantidad de nutrientes y así poder evitar el estrés celular. En un tubo Falcon de 50 mL se colocó 40.5 mL de DMEN, seguido de 9 mL de suero fetal bovino y 0.5 mL de penicilina/estreptomicina, la solución fue homogenizada con ayuda de un vortex todo esto fue realizado en una cabina de flujo laminar 2B, la cual fue previamente esterilizada junto con el material no biológico con alcohol isopropílico y luz UV, el medio completo fue colocado en una estufa a 23°C para mantener la temperatura.

En paralelo se preparó un medio completo al 10% y 15% para su posterior uso, estos medios fueron refrigerados a 5°C para su conservación.

### **3.2.3. Cultivo de células RAW 264.7**

Las células RAW 264.7 se retiraron del tanque de nitrógeno líquido para su descongelamiento, fueron colocadas en baño maría a 37°C, posteriormente en un matraz de cultivo celular T75 se colocó 9 mL del medio de cultivo completo al 20% y 3 mL de células RAW 264.7, finalizando con su incubación en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C, las células fueron monitoreadas cada 24 horas, después del término de los nutrientes el medio

fue reemplazado por un medio completo al 15% y posteriormente el mismo por un medio completo al 10% (Figura 13).



**FIGURA N°14:** Matraz T75 con medio completo y células RAW 264.7.

### 3.3. Elaboración de la curva de calibración

#### 3.3.1. Fundamento

Un procedimiento analítico muy utilizado en análisis cuantitativo es el llamado “curva de calibración”. Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. En el procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito o de algún otro con propiedades muy similares a este (57).

#### 3.3.2. Preparación

Se procedió a realizar una curva de calibración de nitrito usando una solución stock 10 mM seguido de la realización de disoluciones seriadas, se colocó 50  $\mu\text{L}$  de la solución stock en un tubo Eppendorf de 2 mL a continuación se adicionó 950  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura, se homogeneizó la solución y a partir de la misma se procedió a realizar diluciones seriadas, traspasando a otro tubo Eppendorf 200  $\mu\text{L}$  así sucesivamente hasta obtener las concentraciones finales de 500, 100, 50, 10, 5 y 1  $\mu\text{M}$ . En seguida se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración en triplicado y se colocaron en una placa de 96 pozos, la cual fue incubada a 38°C por 1 hora y finalmente leída en un lector de placas a 550 nm (Figura 15).

Los datos obtenidos fueron llevados a la plataforma Microsoft Excel para la elaboración de la curva de calibración y procesamiento de datos.

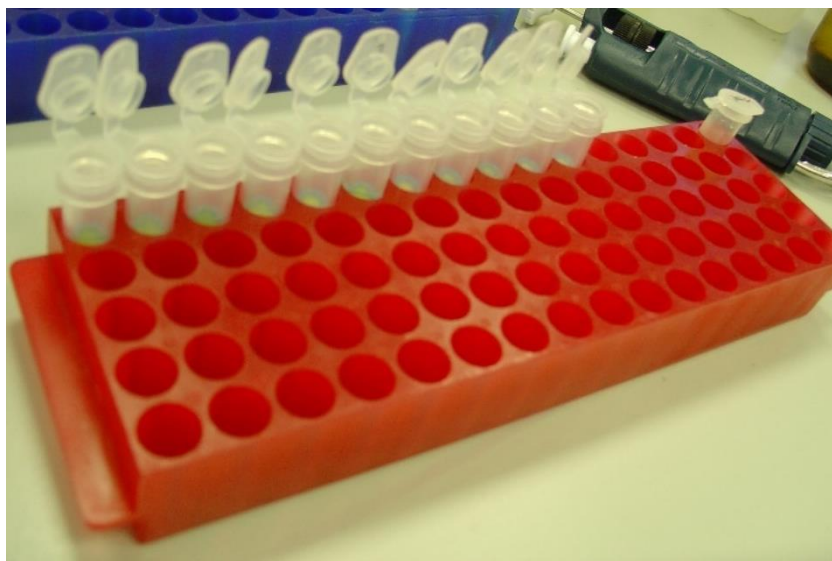
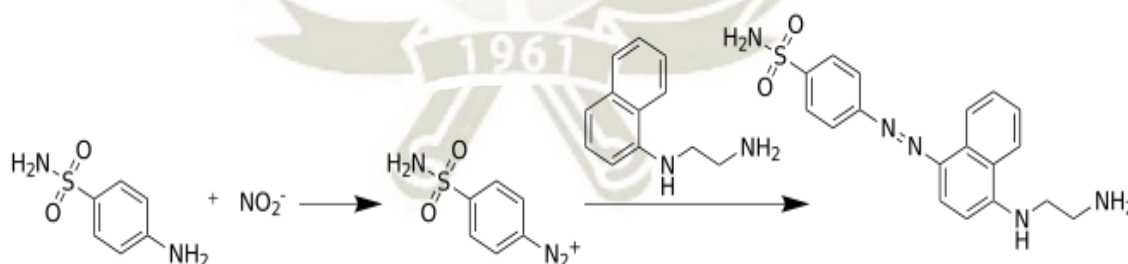


FIGURA N°15: Diluciones seriadas

### 3.4. Elaboración del reactivo de Griess

#### 3.4.1. Fundamento

Esta prueba química detecta la presencia de nitritos y nitratos, es una reacción de diazotación descrita por el científico Peter Griess en 1858. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rosado al tratamiento de una muestra conteniendo  $\text{NO}_2^-$ . Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio y cuando se agrega la  $\alpha$ -naftilamina o la  $\alpha$ -etilendiamina, se desarrolla un color rosado (Esquema 7) (58).



ESQUEMA N°7: Reacción de diazotación de Griess (58).

#### 3.4.2. Preparación del reactivo A

Se inició con la preparación de ácido fosfórico al 5% partiendo de una solución stock de ácido fosfórico al 85%, se disolvió 5.88 mL de la solución stock en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. A continuación, se preparó ácido sulfanílico al 1% disolviendo 108.5 mg en 10.8 mL de ácido fosfórico al 5% previamente preparado.

### 3.4.3. Preparación del reactivo B

Se inició con la preparación de una solución 0.1% p/v de naftiletildiamina disolviendo 10 mg de la misma en 26.6 mL de ácido fosfórico al 5% previamente preparado.

La elaboración del reactivo de Griess se finalizó con la homogenización del reactivo A y el reactivo B por partes iguales 20 mL por cada reactivo en un tubo Falcon de 50 mL.

## 3.5. Preparación del LPS y compuestos tipo nitrona

### 3.5.1. Preparación del LPS bacteriano

El LPS bacteriano de *Escherichia coli*, serotipo 055: B5, L2637, fue retirado de la nevera y puesto en baño maría a 37°C hasta su descongelamiento controlando la temperatura del mismo para evitar que reaccione por el calor, ya que este es un catalizador natural. Después de su descongelamiento se preparó una solución stock de 500 ng/mL de LPS disolviendo 10 µL del mismo en 990 µL de medio completo, se homogenizó en un vortex.

Continuando con la preparación de disoluciones seriadas se tomaron 200 µL de LPS 500 ng/mL y se añadieron 800 µL de medio completo en un tubo Eppendorf de 2 mL, se homogenizó con ayuda de un vortex, en seguida se tomaron 500 µL a otro tubo Eppendorf y se añadió 500 µL de medio completo y así sucesivamente hasta la obtención de las concentraciones deseadas las cuales fueron 100, 50, 10, 5, 1 y 0.5 ng/mL.

### 3.5.2. Elaboración de soluciones a partir de compuestos tipo nitrona

Los compuestos tipo nitrona fueron descongeladas en baño maría a 37°C, se continuó con la preparación al 5% en un tubo Eppendorf de 5 mL se procedió a colocar 100 µL de compuestos tipo nitrona con 2 mL de medio completo, se homogenizó la solución. Se realizó el mismo procedimiento para cada compuesto tipo nitrona que se utilizó.

## 3.6. Pase celular

Después de haber incubado las células en un matraz de cultivo celular T75, se procedió a realizar el pase usando un método mecánico, empleando espátulas de cultivo celular previamente esterilizadas con alcohol isopropílico y luz UV. Después de haber

desprendido las células, se tomó una alícuota de 10 mL y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL, continuando con la centrifugación de las células a 3000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se disolvió en 10 mL de medio completo en un tubo Falcon de 15 mL (Figura 16).



**FIGURA N°16:** Centrifugación de células RAW 264.7 previo pase celular.

### **3.7. Ensayo de viabilidad celular MTT**

#### **3.7.1. Fundamento**

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang (59).

#### **3.7.2. Efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular**

##### **3.7.2.1. Efecto del LPS sobre la viabilidad celular**

Las células RAW 264.7 fueron colocadas en el tubo Falcon de 15 mL, las células se sembraron en una placa de 96 pozos colocando 100  $\mu$ L/pozo se incubó por 24 horas a

38°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>, se observó que las células RAW 264.7 estuvieran adheridas en el fondo de la placa, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionó 50 µL/pozo de LPS usando todas las concentraciones preparadas previamente, el ensayo se realizó por triplicado. A continuación, se dejó incubar la placa por 24 horas a 38°C. Después de las 24 horas de incubación se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar el ensayo adicionando 50 µL/pozo del reactivo de MTT, se dejó incubar la placa por 24 horas finalizando con la lectura de la misma a 550 nm.

### **3.7.2.2. Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular**

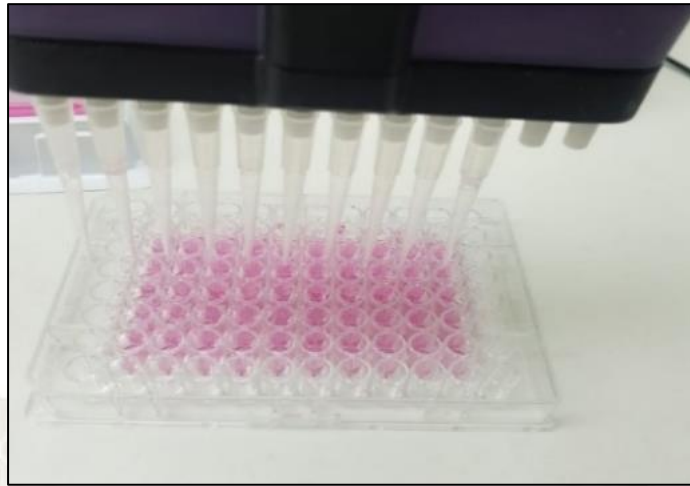
Las células RAW 264.7 fueron colocadas en el tubo Falcon de 15 mL, las células se sembraron en una placa de 96 pozos colocando 100 µL/pozo se incubó por 24 horas a 38°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>, se usó la misma placa del ensayo de viabilidad celular con LPS, los pasos a continuación fueron los mismos que en el ensayo anteriormente mencionado.

## **3.8. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria**

### **3.8.1. Ensayo de producción de nitrito**

Se inició el ensayo con la incubación de células RAW 264.7 colocadas en el tubo Falcon de 15 mL, las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos colocando 100 µL/pozo, se incubaron por 24 horas a 38°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>, a continuación, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 50 µL/pozo de LPS de acuerdo a las concentraciones previamente determinadas en el ensayo de viabilidad celular, dejando incubar por 24 horas, posteriormente se eliminó el sobrenadante, después de la incubación se adicionó 50 µL/pozo de las sustancias tipo nitrona de acuerdo al esquema trazado en el diseño experimental, se dejó incubar por 24 horas a 38°C.

Para concluir el ensayo se adicionó 50 µL/pozo del reactivo de Griess previamente preparado dejando incubar la placa por 30 minutos y finalizando con la lectura de la misma a 550 nm en el lector de placas, los resultados fueron llevados a Microsoft Excel y Minitab 19 para el procesamiento de datos y la extrapolación de acuerdo a la curva de calibración (Figura 17).



**FIGURA N°17:** Ensayo de producción de nitrito.

### 3.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) el cual es un método utilizado para estimar y probar hipótesis respecto a las medias de las poblaciones, sin embargo, es necesario precisar que las poblaciones respecto a las medias dependen de la magnitud de las varianzas observadas. Esta prueba confirmará que grupos son igual o diferentes al 95% de confianza. En conjunto se realizó un análisis comparativo múltiple de Tukey para la creación de intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias de los niveles de factores mientras se controla la tasa de error por grupo. Finalmente se realizó un test de comparaciones múltiples de Dunnett el cual ayudará a crear intervalos de confianza entre las medias de cada factor y la media de un grupo de control, a una  $p < 0.05$ , para estas pruebas de significancia se utilizó el software Microsoft Excel y Minitab 19 (59).

### CAPÍTULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto de investigación se evaluó el efecto antiinflamatorio de compuestos tipo nitrona usando un modelo de células RAW 264.7 activadas por lipopolisacárido.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

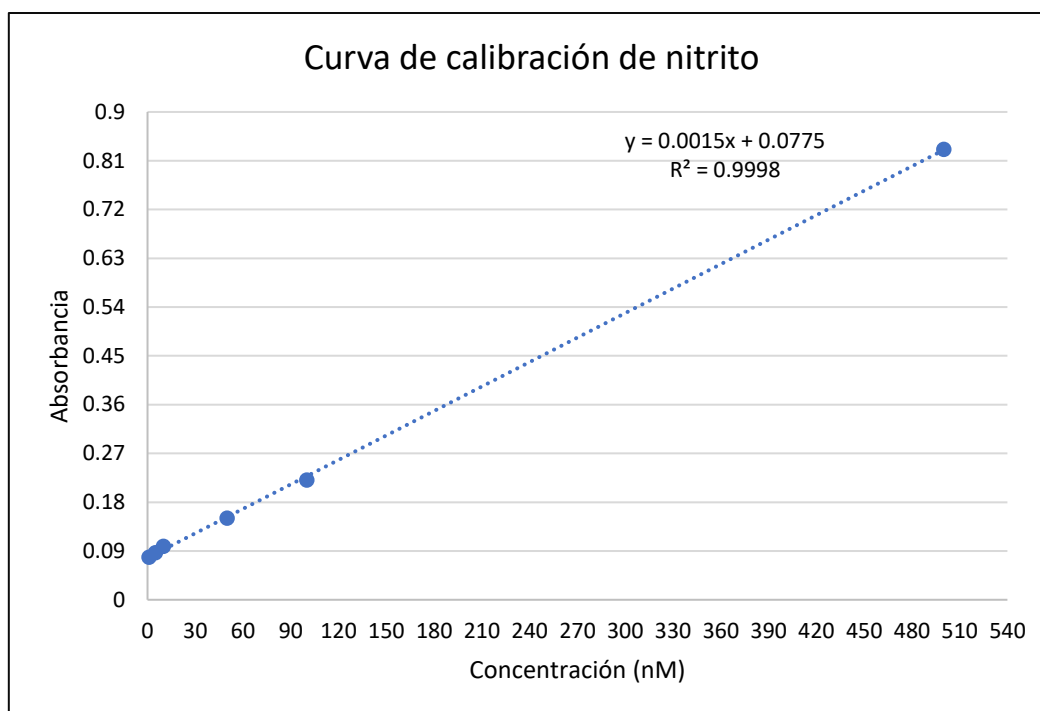
##### 1. Curva de calibración de nitrito

Se realizó una curva de calibración de nitrito por medio de diluciones seriadas a partir de una solución stock de 10 mM en agua ultrapura, a partir de la cual se obtuvieron 6 concentraciones diferentes 1, 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ , como blanco se usó agua ultrapura, las cuales dieron como resultado tras ser leídas a 550 nm las siguientes absorbancias:

**TABLA N°2:** Absorbancias de la curva de calibración

Patrones	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Media bruta	Media neta
		A500nm	A500nm
Blanco	0	0.00794	-
1	1	0.07870	0.07076
2	5	0.08710	0.07916
3	10	0.09860	0.09066
4	50	0.14060	0.13266
5	100	0.22080	0.21286
6	500	0.83130	0.82336

Culminado la transcripción de datos obtenidos gracias a las lecturas obtenidas se procedió a la elaboración de la curva de calibrado obteniéndose la siguiente:



**FIGURA N°18:** Curva de calibración de nitrito.

El sistema de color obtenido obedece a la ley de Lambert-Beer, las absorbancias obtenidas ayudarán para la determinación de la concentración de nitrito producido por las células RAW 264.7 activadas por lipopolisacárido.

## 2. Ensayo de viabilidad celular MTT

### 2.1. Efecto del LPS sobre la viabilidad celular

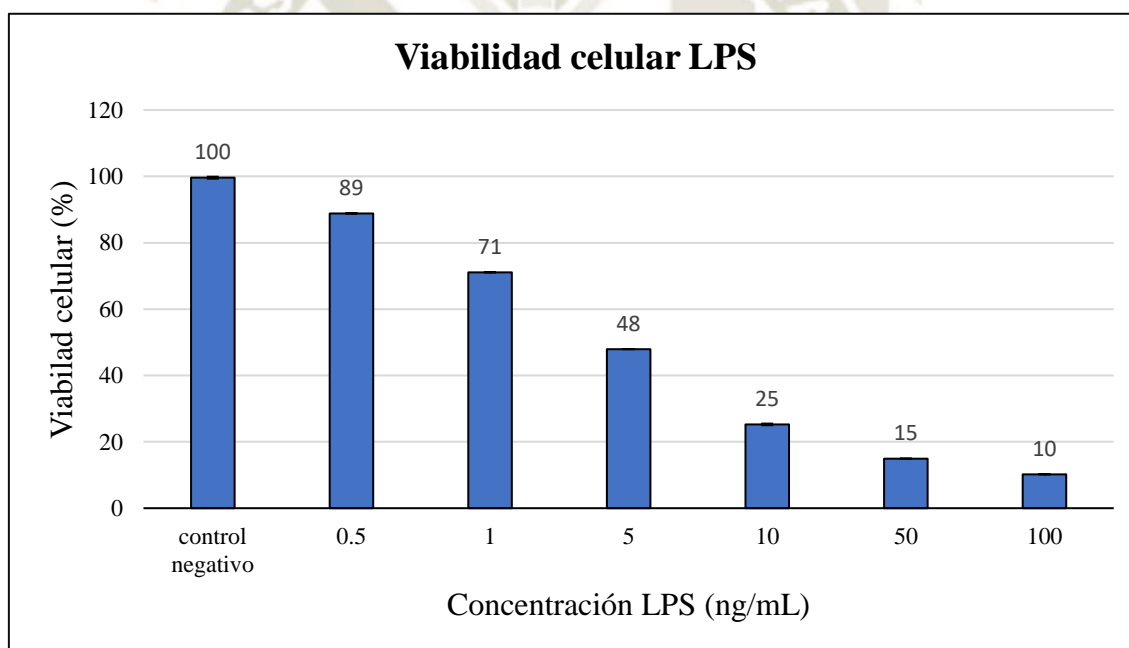
Para identificar que concentración de LPS es la más adecuada para activar las células RAW 264.7, sin que esta cause toxicidad superior al 50%, se realizó un ensayo de viabilidad celular por MTT. En la tabla 3 se puede observar los resultados obtenidos, donde se muestra que las concentraciones menos tóxicas son: 0.5, 1 y 5 ng/mL debido a que presentaron una viabilidad celular por encima del 50%.

Las concentraciones que presentaron viabilidad celular menor al 40% fueron descartadas para su uso, debido a que probablemente estas concentraciones ocasionarían en las células un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, lo que potencia la producción de nitrito en la célula y este al estar presente en grandes cantidades es tóxico para las células, ocasionando muerte celular.

**TABLA N°3:** Efecto del LPS sobre la viabilidad celular.

Muestra	Concentración (ng/mL)	Media neta A550nm	% Viabilidad celular	Desviación estándar	Grupos iguales
B	Blanco	-	100	0.30	-
c-	Control negativo	0.9921	99	0.30	A
LPS1	0.5	0.8844	88	0.03	B
LPS2	1	0.7069	71	0.03	C
LPS3	5	0.4753	48	0.03	D
LPS4	10	0.2484	25	0.24	E
LPS5	50	0.1451	15	0.01	F
LPS6	100	0.0981	10	0.03	G

En la figura 19 se observan los porcentajes de viabilidad celular producida por las diferentes concentraciones de LPS.



**FIGURA N°19:** Efecto del LPS sobre la viabilidad celular.

Nótese que para poder deducir cuáles serán las concentraciones más adecuadas para la activación de las células RAW 264.7, que a su vez no sean tóxicas para las mismas, fue necesario la inclusión de un control negativo el cual fue células RAW 264.7 con medio completo para poder obtener un porcentaje de viabilidad celular por encima del 95 %, esto permitió un estudio comparativo de las diferentes concentraciones de LPS sobre el efecto que tiene en la viabilidad celular (60).

**TABLA N°4:** Test de ANOVA del efecto de las diferentes concentraciones de LPS sobre la viabilidad celular.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	2.35107234	6	0.39184539	176242.304	2.5664E-33	2.847726
<b>Dentro de los grupos</b>	3.1127E-05	14	2.2233E-06			
<b>Total</b>	2.35110347	20				

En la tabla 4 se demuestra que el efecto de las diferentes concentraciones de lipopolisacárido 0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 ng/mL sobre la viabilidad celular, fueron significativamente diferentes esto se corroboró con un análisis de varianza ANOVA de una vía, el valor F experimental es mayor al valor del F crítico, por lo cual se llega a la conclusión que al menos una de las concentraciones de lipopolisacárido es diferente de las demás con un 95% de confianza.

**TABLA N°5:** Test de Tukey del efecto de las diferentes concentraciones de LPS sobre la viabilidad celular.

Factor	N	Media	Agrupación
c-	3	99.627	A
LPS1	3	88.856	B
LPS2	3	71.113	C
LPS3	3	47.950	D
LPS4	3	25.260	E
LPS5	3	14.930	F
LPS6	3	10.233	G

Se comprobó que los grupos experimentales son diferentes, teniendo una diferencia significativa a un 95% de confianza, este test realizado refuerza el resultado obtenido en el test de ANOVA, concluyendo que el efecto de las concentraciones de lipopolisacárido sobre la viabilidad celular es diferente.

## 2.2. Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular

Para evaluar la toxicidad de los compuestos tipo nitrona se realizó un ensayo de viabilidad celular por MTT, ya que lo que se busca antes de continuar con la investigación, es comprobar si las sustancias tipo nitrona no son tóxicas para las células RAW 264.7,

debido a que estas al ser compuestos químicos pueden provocar reacciones químicas y estas a su vez muerte celular.

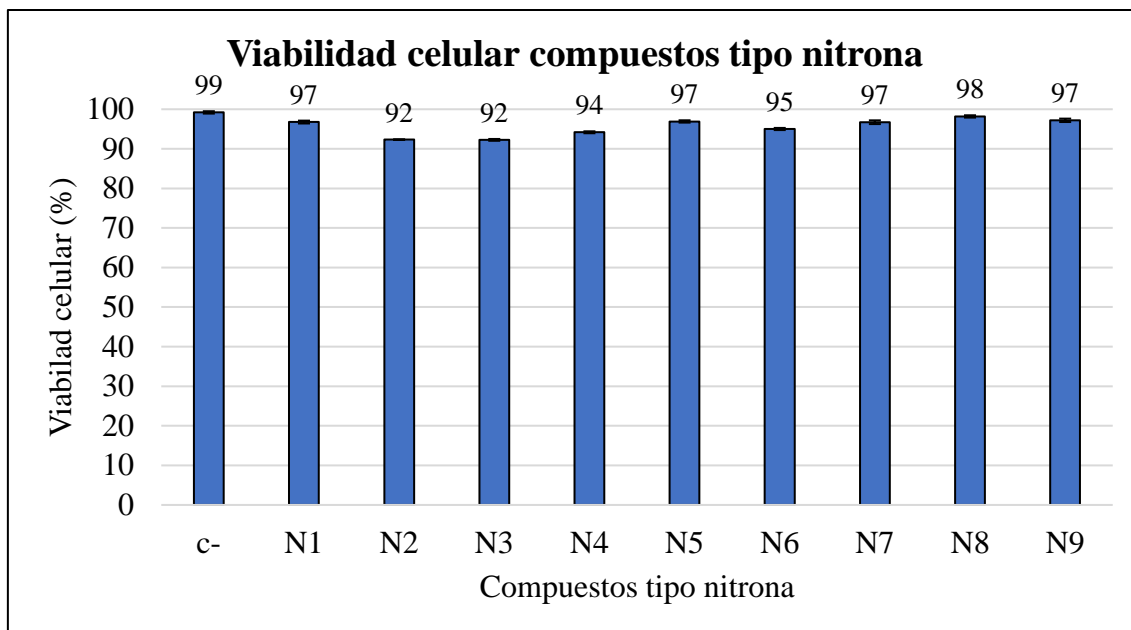
Después de haber realizado el ensayo de viabilidad celular se comprobó que los compuestos tipo nitrona no son tóxicos para las células RAW 264.7, ya que todos los compuestos presentaron una viabilidad celular mayor al 92%, lo que demuestra que al entrar en contacto con las células estos compuestos no alteran la biología de las células. En la literatura anteriormente no se investigó las nitronas usadas en este estudio, sin embargo, Saira Cancela en noviembre del 2015 estudio los efectos de otras nitronas sobre la viabilidad celular, estas presentaron una viabilidad celular del 100% a una concentración de 25  $\mu$ M, lo cual refuerza el resultado establecido en la presente investigación (61).

**TABLA N°6:** Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

Descripción	Media neta A550nm	% Viabilidad celular	Desviación estándar	Grupos iguales
B	-	-	-	-
c-	0.9920	99	0.30	A
N1	0.9676	97	0.36	C
N2	0.9232	92	0.02	E
N3	0.9226	92	0.23	E
N4	0.9418	94	0.24	D
N5	0.9692	97	0.29	C
N6	0.9501	95	0.27	D
N7	0.9672	97	0.47	C
N8	0.9818	98	0.29	B
N9	0.9720	97	0.43	C

En la figura 20 se puede observar los porcentajes de viabilidad celular producidas por los compuestos tipo nitrona después de haber realizado el test de viabilidad celular por MTT.

Todos los compuestos tipo nitrona presentaron una viabilidad celular por encima del 90%, esto indicó que las células producen en menos cantidad lactato deshidrogenasa a nivel mitocondrial debido a que no hay un gran daño tisular causado durante la reacción. Los compuestos tipo nitrona no son tóxicos para las células RAW 264.7, este resultado permitió continuar con la investigación.



**FIGURA N°20:** Efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

En conclusión, hubo una menor cantidad de formazano formado debido a la reacción de sales de tetrazolio por acción del  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}^+$  formados (62).

**TABLA N°7:** Test de ANOVA del efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	0.01503658	9	0.00167073	167.940809	7.5706E-17	2.39281411
<b>Dentro de los grupos</b>	0.00019897	20	9.9483E-06			
<b>Total</b>	0.01523555	29				

El efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular es significativamente diferente (LQB-106, LBQ-109, LBQ-110, LBQ-124, LBQ-131, LBQ-134, LBQ-141, LBQ-467 y LBQ-476) tal como se muestra en la tabla N°7, después de haber realizado el análisis de varianza de ANOVA se comprobó que al menos 1 de los compuestos tipo nitrona es diferente, ya que el valor de F experimental es mayor al valor del F crítico, a un 95% de confianza.

Después de haber realizado el análisis de varianza ANOVA y comprobar que al menos una de las nitronas es diferente se procedió a hacer un test de Tukey para conocer que compuestos tipo nitrona son iguales y cuales son diferentes, los resultados fueron los siguientes:

**TABLA N°8:** Test de Tukey del efecto de los compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
c-	3	99.62	A
N8	3	98.60	B
N9	3	97.62	C
N5	3	97.34	C
N1	3	97.18	C
N7	3	97.14	C
N6	3	95.43	D
N4	3	94.60	D
N2	3	92.74	E
N3	3	92.68	E

Se comprobó que hay 4 grupos diferentes compuestos por las siguientes nitronas: grupo B (N8), grupo C (N1, N5, N7 y N9), grupo D (N6 y N4) y por último el grupo E (N2 y N3) esto indicó que puede haber una mínima variación al momento de evaluar su efecto sobre la viabilidad celular, sin embargo, no fue significativa ya que la viabilidad celular de todas las nitronas estuvo por encima del 90% lo cual fue óptimo para su uso.

**TABLA N°9:** Test de Dunnett sobre del efecto de los compuestos tipo nitrona con el control negativo.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
c-	3	99.62	A
N8	3	98.60	
N9	3	97.62	
N5	3	97.34	
N1	3	97.18	
N7	3	97.14	
N6	3	95.43	
N4	3	94.60	
N2	3	92.74	
N3	3	92.68	

Así mismo después de conocer que nitronas eran diferentes se complementó el estudio estadístico con un test de Dunnett el cual dio como resultado una diferencia

significativa entre el grupo control negativo y las nueve nitronas tratadas, a un nivel de confianza del 95%.

### **3. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria**

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria se usó un modelo de células RAW 264.7, estas son macrófagos de tipo m1 (inflamatorios) que al momento de entrar en contacto con el LPS se activan, liberando toda una cascada de señalización intracelular que finaliza con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, este cuando está activo produce especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por acción de los radicales libres.

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con uno de los principales mensajeros intracelulares y transcelulares de la inflamación producida por los macrófagos, el óxido nítrico el cual en niveles normales cumple varias funciones siendo las principales la destrucción de los microorganismos fagocitados por el macrófago y como mensajero transcelular en la regulación de la vasopresión. Cuando el óxido nítrico se encuentra en cantidades elevadas gracias a la excesiva cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producida por el exceso de LPS bacteriano se vuelve un inhibidor reversible del complejo IV mitocondrial, este al estar inhibido interrumpe la cadena respiratoria y a su vez produce vasodilatación lo que puede llevar a fallos respiratorios finalizando con la muerte (63).

#### **3.1. Ensayo de producción de nitrito**

El ensayo realizado es una manera indirecta de medir el óxido nítrico producido ya que este no forma una reacción de diazotación con el reactivo de Griess, a diferencia de los nitritos que si lo hacen (64).

Se procedió a realizar el cultivo de células RAW 264.7 en una placa de 96 pozos con medio completo, después se adicionó LPS bacteriano a concentraciones de 0.5, 1 y 5 ng/mL, las cuales fueron determinadas en el ensayo de viabilidad celular realizado anteriormente, esto dio lugar a la activación de las células RAW 264.7 y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual inicio la producción de nitritos por acción de los radicales libres formados en cantidades elevadas.

Para finalizar el ensayo se adicionó los compuestos tipo nitrona y después de 24 horas de incubación se agregó el reactivo de Griess, los compuestos tipo nitrona cumplieron con la función de atrapar los radicales libres lo que impidió la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, esto evitó la producción elevada de nitrito, a

su vez se realizó este mismo ensayo pero sin LPS con la finalidad de observar si los compuestos tipo nitrona ayudan a la producción de nitritos o no reaccionan con las células, los resultados fueron los siguientes:

### 3.1.1. Producción de nitrito por los compuestos tipo nitrona

Después de haber realizado los ensayos correspondientes se comprobó que los 9 compuestos tipo nitrona analizados no reaccionan con las células RAW 264.7, lo cual nos indica que los compuestos tipo nitrona no provocan reacciones químicas o enzimáticas que podrían favorecer la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y a su vez radicales libres.

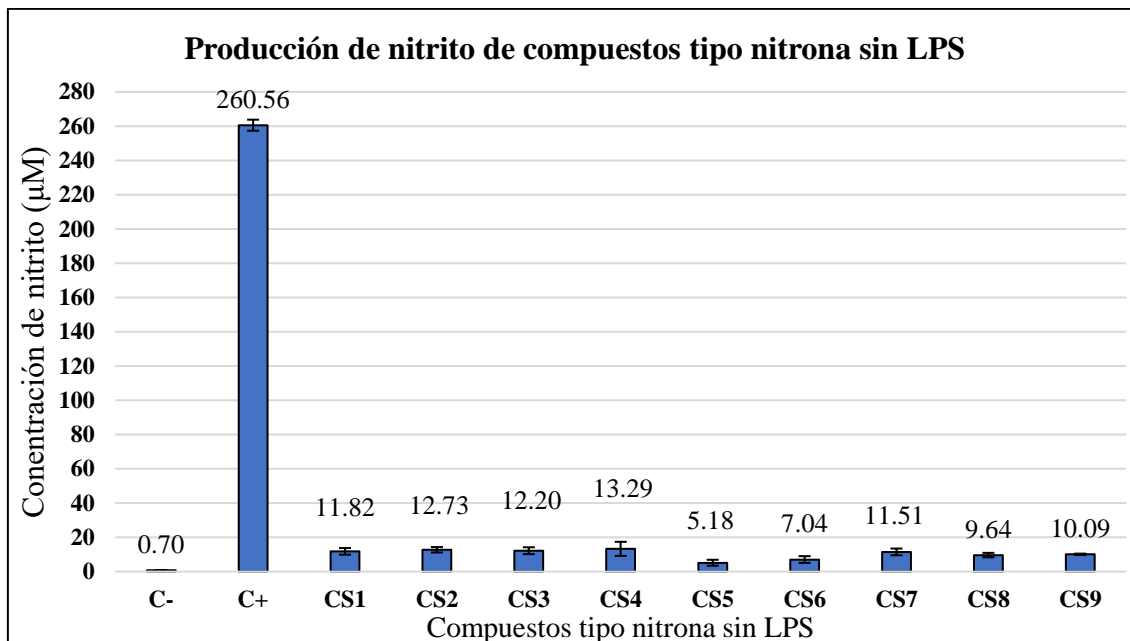
Después de extrapolar las absorbancias se observó que la concentración de nitritos obtenidos se encuentra entre 5.1 y 13.2  $\mu\text{M}$  para cada nitrona empleada, sin la presencia de lipopolisacárido que active a las células RAW 264.7 (65).

**TABLA N°10:** Producción de nitrito por compuestos tipo nitrona

Muestra	Media neta A550nm	Concentración nitrito ( $\mu\text{M}$ )	Desviación estándar	Grupos iguales
B	-	-	-	-
C-	0.0762	0.70	0.00	E
C+	0.4562	260.56	3.23	-
CS1	0.0831	11.82	1.93	A B
CS2	0.0845	12.73	1.59	A B
CS3	0.0837	12.20	2.01	A B
CS4	0.0853	13.29	4.10	A B
CS5	0.0732	5.18	1.74	C D
CS6	0.0760	7.04	1.98	B C D
CS7	0.0827	11.51	1.95	A B
CS8	0.0799	9.64	1.30	A B C
CS9	0.0805	10.09	0.40	A B C

En la figura 21 observamos que los compuestos tipo nitrona producen cantidades bajas de nitrito, esto nos indica que no interaccionan con las células RAW 264.7, la concentración de nitritos esta entre 95 y 98%, el cual es inferior al producido por las células tratadas con LPS 0.1 ng/mL. En 2013 se realizaron estudios sobre la capacidad de producción de nitritos del DMPO, el cual es la nitrona más estudiada, Este estudio se

realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental en el 2013 por el Dr. Dario C. Ramírez, Dra. Sandra E. Gomez-Mejiba, dando como resultado una producción no significativa de nitritos la cual se encontraba entre 5 y 8  $\mu\text{M}$  (65).



**FIGURA N°21:** Ensayo de producción de nitrito por compuesto tipo nitrona sin presencia de LPS.

Se realizó un análisis de varianza para comprobar si los compuestos tipo nitronas eran iguales, se obtuvo como resultado lo siguiente:

**TABLA N°11:** Test de ANOVA sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	431.863962	9	47.9848847	12.0938679	2.6115E-06	2.39281411
<b>Dentro de los grupos</b>	79.3540742	20	3.96770371			
<b>Total</b>	511.218036	29				

Se concluyó que al menos uno de los compuestos tipo nitrona es significativamente diferente a los demás, con un nivel de confianza del 95%, esto puede indicar que el efecto de los compuestos es diferente al momento de interactuar con las

células RAW 264.7, provocando un aumento mínimo de nitritos, los cuales son parte del mecanismo celular de los macrófagos al momento de realizar la fagocitosis.

Para poder identificar que nitronas son significativamente diferentes se realizó un análisis de comparación múltiple de Tukey, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**TABLA N°12:** Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona.

Factor	N	Media	Agrupación
CS4	3	13.29	A
CS2	3	12.73	A B
CS3	3	12.20	A B
CS1	3	11.82	A B
CS7	3	11.51	A B
CS9	3	10.09	A B C
CS8	3	9.64	A B C
CS6	3	7.04	B C D
CS5	3	5.18	C D
C-	3	0.70	E

Los compuestos tipo nitrona 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 son iguales por lo tanto poseen la misma capacidad de disminuir la concentración de nitritos, a su vez el compuesto tipo nitrona 6 es igual a los compuestos antes mencionados a excepción del compuesto 4. Finalmente, el compuesto 5 es diferente a la gran mayoría de compuestos a excepción del compuesto 6, 8 y 9.

**TABLA N°13:** Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona.

Factor	N	Media	Agrupación
C-	3	0.70	A
CS4	3	13.29	
CS2	3	12.73	
CS3	3	12.20	
CS1	3	11.82	
CS7	3	11.51	
CS9	3	10.09	
CS8	3	9.64	
CS6	3	7.04	
CS5	3	5.18	

Para corroborar si existe igualdad entre los compuestos tipo nitrona y el control negativo se realizó un test de Dunnett lo que comprobó que los compuestos tipo nitrona no son iguales al control negativo a un 95% de confianza.

### 3.1.2. Compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL

Después de realizar los ensayos con la presencia de LPS en concentración 0.5 ng/mL se pudo observar que los compuestos tipo nitrona disminuyen los niveles de nitritos entre 94 y 97%, los compuestos C1, C7, C8 y C9 disminuyeron los niveles de nitrito considerablemente en un 94%, después de la extrapolación de datos se observó que estos compuestos presentan una concentración de nitritos entre 14.6 y 16.3  $\mu\text{M}$ . A su vez los compuestos C2, C3, C5 y C6 cumplieron la misma función la cual fue disminuir la concentración de nitrito considerablemente en un 97% con la única diferencia que presentaron una concentración de nitritos entre presentando una concentración entre 7.4 y 9.4  $\mu\text{M}$ , finalmente el compuesto C4 7.4 y 9.4  $\mu\text{M}$  la cual es menor a los compuestos antes mencionados.

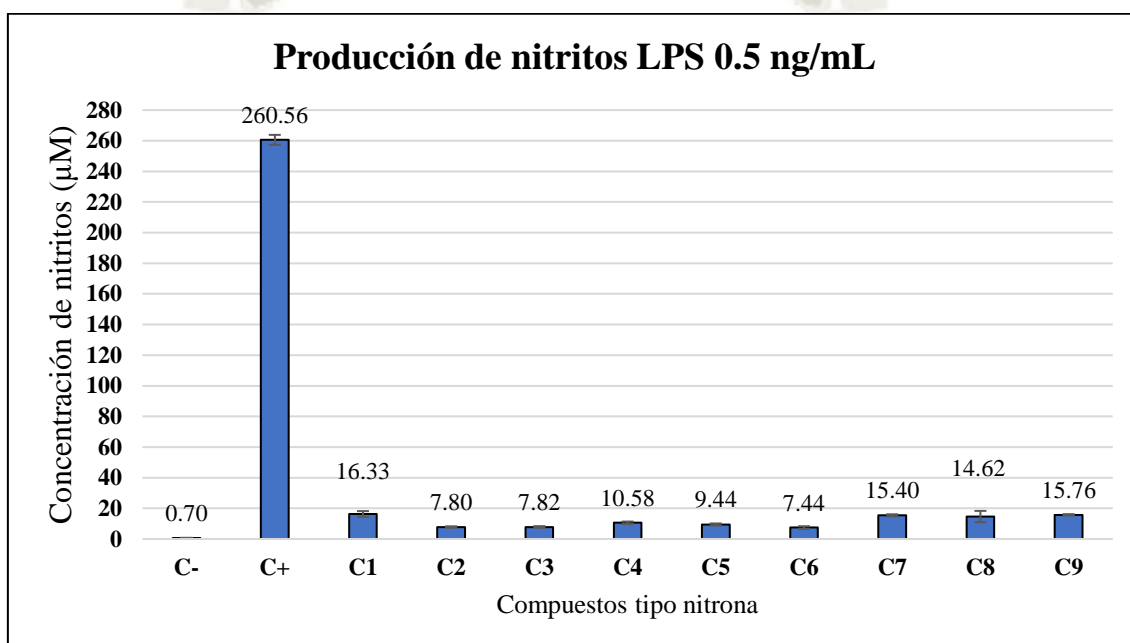
**TABLA N°14:** Producción de nitrito con LPS 0.5 ng/mL.

Muestra	Media neta A550nm	Concentración nitrito ( $\mu\text{M}$ )	Desviación estándar	Grupos iguales
B	-	-	-	-
C-	0.0705	0.70	0.00	E
C+	0.4562	260.56	3.23	-
C1	0.0899	16.33	1.86	A
C2	0.0771	7.80	0.47	C
C3	0.0771	7.82	0.54	C
C4	0.0813	10.58	0.80	B C
C5	0.0796	9.44	0.69	C
C6	0.0766	7.44	0.87	C D
C7	0.0885	15.40	0.69	A
C8	0.0873	14.62	3.72	A B C
C9	0.0890	15.76	0.45	A C

En la figura 22 se puede observar que las sustancias tipo nitrona disminuyen la concentración de nitritos en presencia de LPS 0.5 ng/mL, evitando la producción y reacción de las mismas. Esto nos indica que los 9 compuestos tipo nitrona evitaron la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, por medio de la captura de radicales libres, estos son los involucrados en la formación de las dos especies reactivas, los radicales libres realizan una reacción redox con los nitritos producidos por las células RAW 264.7, el posible mecanismo por el cual se evitó este proceso fue la formación de

una trampa de spin entre las nitronas y los radicales libres presentes en el medio, el encargado de esta acción es el radical  $O^-$  presente en todas las nitronas el cual se une a los radicales libres (66).

Estudios previos sobre la capacidad antiinflamatoria del DMPO demostraron que este nitrona provocaba una disminución en los niveles de nitritos entre 95 y 99% Este estudio se realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental en el 2013 por el Dr. Dario C. Ramírez, Dra. Sandra E. Gomez-Mejiba (65).



**FIGURA N°22:** Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL.

Se realizó un análisis de varianza para comprobar si las 9 nitronas tratadas son iguales y por lo tanto poseen el mismo efecto antiinflamatorio, los resultados fueron los siguientes:

**TABLA N°15:** Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 0.5 ng/mL.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	670.582556	9	74.5091728	36.6038513	1.7121E-10	2.39281411
<b>Dentro de los grupos</b>	40.7111111	20	2.03555556			
<b>Total</b>	711.293667	29				

Se concluyó que al menos uno de los compuestos tipo nitrona es significativamente diferente a los demás en presencia de LPS 0.5 ng/mL, con un nivel de confianza del 95%, esto puede indicar que el efecto de los compuestos es diferente al momento de interactuar con las células RAW 264.7 previamente activadas por lipopolisacárido lo que puede provocar un aumento mínimo de nitritos producidos.

**TABLA N°16:** Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL.

Factor	N	Media	Agrupación
C1	3	16.33	A
C9	3	15.76	A
C7	3	15.40	A
C8	3	14.62	A B
C4	3	10.58	B C
C5	3	9.44	C
C3	3	7.82	C
C2	3	7.80	C
C6	3	7.44	C D
C-	3	0.70	E

El compuesto tipo nitrona 1, 7, 8 y 9 son iguales por lo tanto poseen en gran parte la misma capacidad de disminuir la producción de nitritos, a su vez el compuesto tipo nitrona 8 es igual a los compuestos antes mencionados a excepción de los compuestos 2, 3, 4, 5 y 6.

**TABLA N°17:** Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/mL

Factor	N	Media	Agrupación
C-	3	16.33	A
C1	3	15.76	
C9	3	15.40	
C7	3	14.62	
C8	3	10.58	
C4	3	9.44	
C5	3	7.82	
C3	3	7.80	
C2	3	7.44	
C6	3	0.70	

Para corroborar si no existe igualdad entre los compuestos tipo nitrona y el control negativo fue necesario realizar un test de Dunnett lo que comprobó que ninguno de los compuestos es igual al control negativo a un 95% de confianza.

### 3.1.3. Compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL

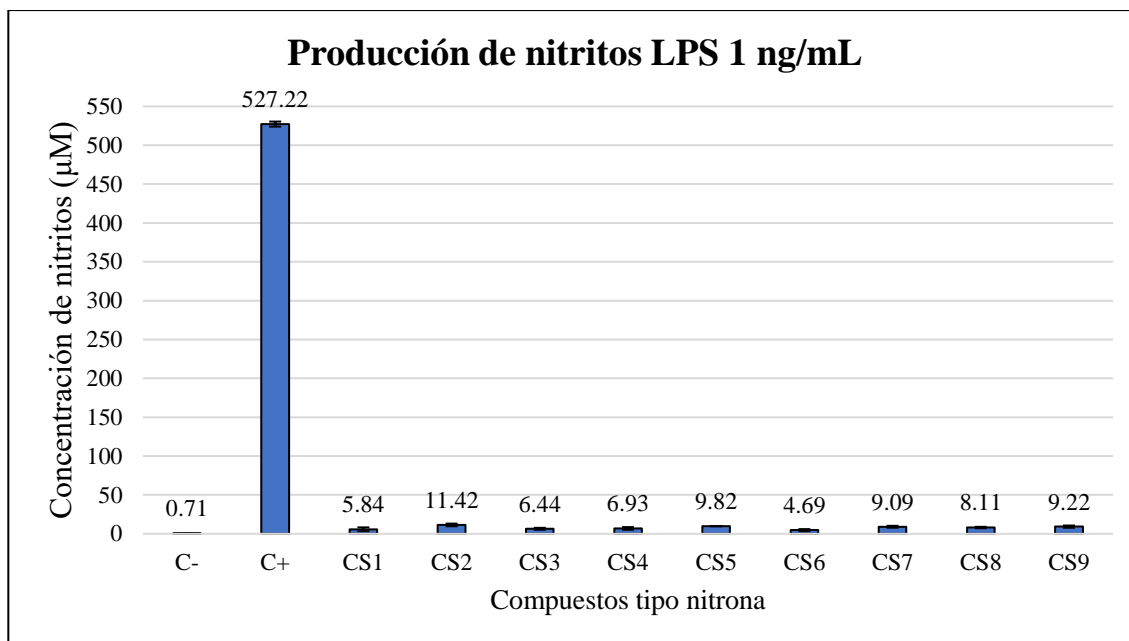
Después de realizar los ensayos con la presencia de LPS en concentración 1 ng/mL se pudo observar que los compuestos C2, C5, C7, C8 y C9 disminuyeron considerablemente los niveles de nitritos en 98%, después de la extrapolación de datos se observó que estos compuestos tuvieron una concentración entre 8.1 y 11.4  $\mu\text{M}$ . A su vez los compuestos C1, C3, C4 y C6 disminuyó los niveles de nitrito en 99%, presentando una concentración de nitritos entre 4.6 y 6.9  $\mu\text{M}$ , las cuales son menores a los compuestos antes mencionados, pero dicha diferencia no influye en la capacidad que tienen los compuestos tipo nitrona para disminuir los niveles de nitrito.

**TABLA N°18:** Producción de nitrito con LPS 1 ng/mL.

Muestra	Media neta A550nm	Concentración nitrito ( $\mu\text{M}$ )	Desviación estándar	Grupos iguales
B	-	-	-	-
C-	0.0705	0.71	0.01	E
C+	0.8562	527.22	3.23	-
C1	0.0742	5.84	2.44	C D
C2	0.0825	11.42	1.71	A
C3	0.0751	6.44	1.23	C D
C4	0.0758	6.93	1.72	C D
C5	0.0801	9.82	0.19	A B
C6	0.0724	4.69	1.36	D
C7	0.0790	9.09	1.22	A B
C8	0.0776	8.11	0.89	A B
C9	0.0792	9.22	1.44	A B

En la figura 23 se puede observar que las sustancias tipo nitrona mantienen los niveles bajos de nitrito en presencia de LPS 1 ng/mL, evitando la producción y reacción de las mismas. La concentración de LPS no interfirió significativamente en la función de las sustancias tipo nitrona. Se observó que el porcentaje de producción de nitrito se disminuyó entre 98 y 99%, lo que probablemente se deba a la poca presencia de radicales libres formados por acción del LPS al activarse el factor de transcripción Nf-kB. El posible mecanismo por el cual los radicales libres no estén presentes al momento de la reacción para formar nitritos es la formación de una trampa de spin la cual es la encargada de captar los radicales libres producidos y así evitar la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como lo son los nitritos (66).

Estudios previos sobre la capacidad antiinflamatoria del DMPO demostraron que este nitrona provocaba una disminución en los niveles de nitritos entre 95 y 99%. Este estudio se realizó en el laboratorio de medicina traduccional y experimental en el 2013 por el Dr. Dario C. Ramírez, Dra. Sandra E. Gomez-Mejiba (65).



**FIGURA N°23:** Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL.

Se realizó un análisis de varianza para comprobar si las 9 nitronas tratadas son iguales y por lo tanto poseen el mismo efecto antiinflamatorio, los resultados fueron los siguientes:

**TABLA N°19:** Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 1 ng/mL.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	252.132517	9	28.0147241	14.2942827	6.7414E-07	2.39281411
<b>Dentro de los grupos</b>	39.1971037	20	1.95985519			
<b>Total</b>	291.329621	29				

Se concluyó que al menos uno de los compuestos tipo nitrona es significativamente diferente a los demás en presencia de LPS 1 ng/mL, con un nivel de

confianza del 95%, esto puede indicar que el efecto de los compuestos es diferente al momento de interactuar con las células RAW 264.7 previamente activadas por lipopolisacárido lo que puede provocar un aumento mínimo de nitritos producidos.

**TABLA N°20:** Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
C2	3	11.42	A
C5	3	9.82	A B
C9	3	9.11	A B
C7	3	9.09	A B
C8	3	8.11	A B
C4	3	6.93	C D
C3	3	6.44	C D
C1	3	5.84	C D
C6	3	4.69	D
C-	3	0.71	E

Los compuestos tipo nitrona 2, 5, 7, 8 y 9 son iguales por lo tanto poseen en gran parte la misma capacidad de disminuir la producción de nitritos, a su vez el compuesto tipo nitrona 2 es diferente. Finalmente, compuestos 1, 3, 4 y 6 son iguales entre sí, pero diferentes al control negativo por lo que se concluye que estos compuestos disminuyen considerablemente la concentración de nitritos.

**TABLA N°21:** Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
C2	3	11.42	
C5	3	9.82	
C9	3	9.11	
C7	3	9.09	
C8	3	8.11	
C4	3	6.93	
C3	3	6.44	
C1	3	5.84	
C6	3	4.69	
C-	3	0.71	A

Para corroborar la diferencia de los compuestos tipo nitrona con el control negativo fue necesario realizar un test de Dunnett lo que comprobó que ninguno de los compuestos es igual al control negativo, por lo tanto, no disminuyen la producción de nitritos 100%, a un 95% de confianza.

### 3.1.4. Compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL

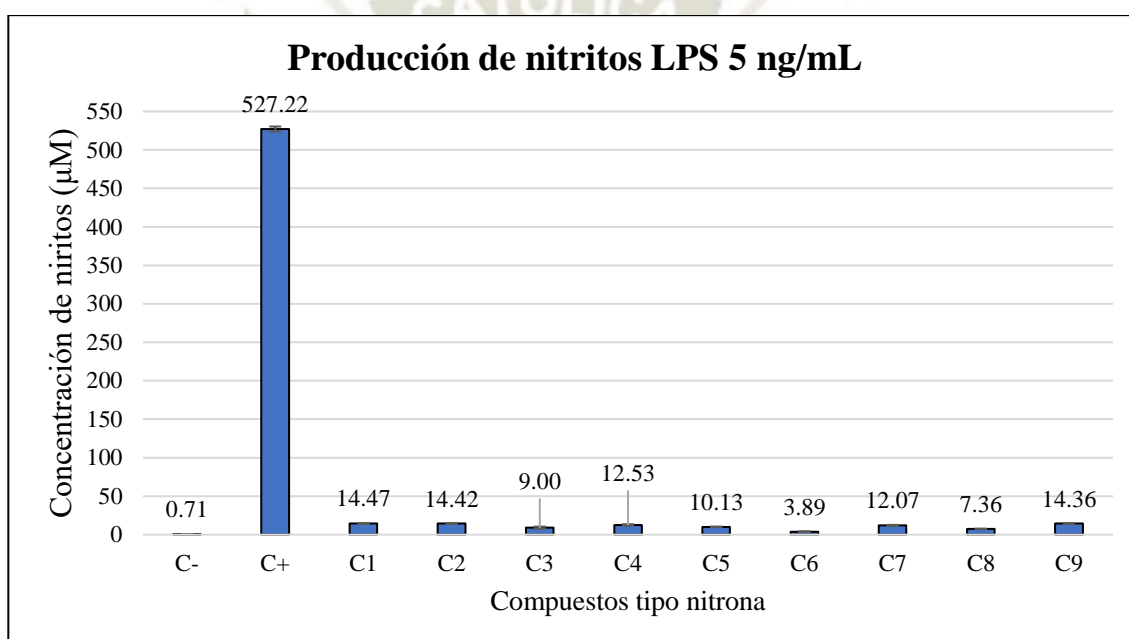
Después de realizar los ensayos con la presencia de LPS en concentración 5 ng/mL se pudo observar que los compuestos C1, C2, C4, C5, C7 y C9, disminuyeron los niveles de nitrito entre 97 y 98%, presentando una concentración de nitritos entre 12 y 14.4  $\mu\text{M}$ . A su vez los compuestos C3, C6 y C8, cumplieron la misma función la cual fue disminuir los niveles de nitrito entre 98 y 98%, después de la extrapolación de datos se observó que estos compuestos presentan una concentración entre 3.8 y 9  $\mu\text{M}$ .

Habiendo realizado los tres ensayos con las diferentes concentraciones de LPS se pudo observar que las sustancias tipo nitrona cumplen la función de disminuir la cantidad de nitrito, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por medio de la captura de radicales libres por el posible mecanismo llamado trampa de spin captando los mismos y evitando su reacción con los nitritos (66).

**TABLA N°22:** Producción de nitrito con LPS 5 ng/mL.

Muestra	Media neta A550nm	Concentración nitrito ( $\mu\text{M}$ )	Desviación estándar	Grupos iguales
B	-	-	-	-
C-	0.0705	0.71	0.01	D
C+	0.8562	527.22	3.23	-
C1	0.0871	14.47	0.20	A
C2	0.0870	14.42	0.49	A
C3	0.0762	9.00	1.45	B C
C4	0.0809	12.53	0.98	A B
C5	0.0806	10.13	0.35	A B
C6	0.0716	3.89	0.17	C
C7	0.0825	12.07	0.58	A B
C8	0.0764	7.36	0.34	B C
C9	0.0869	14.36	0.54	A

En la figura 24 se puede observar que las sustancias tipo nitrona disminuyen la concentración de nitrito en presencia de LPS 5 ng/mL, evitando la producción y reacción de las mismas, los compuestos tipo nitrona disminuyeron considerablemente los niveles de nitrito el porcentaje estuvo entre 97 y 99%. La concentración de LPS no interfirió en la función de las sustancias tipo nitrona en ninguno de los tres ensayos realizados. Uno de los posibles mecanismos por el cual las nitronas evitan la producción de nitritos sería la formación de una trampa de spin encargada de la captura de radicales libres, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y cuando estas sobrepasan la capacidad de captar los radicales libres lo hacen, pero en menor cantidad la cual no es muy significativa.



**FIGURA N°24:** Ensayo de producción de nitrito, compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL.

Se realizó un análisis de varianza para comprobar si las 9 nitronas tratadas son iguales, los resultados fueron los siguientes:

**TABLA N°23:** Test de ANOVA producción de nitritos con LPS 5 ng/mL.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	601.95699	9	66.88411	158.02037	1.377E-16	2.3928141
<b>Dentro de los grupos</b>	8.4652519	20	0.4232626			
<b>Total</b>	610.42224	29				

Se concluyó que al menos uno de los compuestos tipo nitrona es significativamente diferente a los demás en presencia de LPS 5 ng/mL, con un nivel de confianza del 95%, esto puede indicar que el efecto de los compuestos es diferente al momento de interactuar con las células RAW 264.7 previamente activadas por lipopolisacárido lo que puede provocar un aumento mínimo de nitritos producidos.

**TABLA N°24:** Test de Tukey sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
C1	3	14.47	A
C2	3	14.42	A
C9	3	14.36	A
C7	3	12.07	A B
C4	3	12.53	A B
C5	3	10.13	A B
C8	3	7.36	B C
C3	3	9.00	B C
C6	3	3.89	C
C-	3	0.71	D

Los compuestos tipo nitrona 1, 2, 4, 5, 7 y 9 son iguales por lo tanto poseen en gran parte la misma capacidad de disminuir la concentración de nitritos, así como los compuestos 3, 4, 5, 7 y 8. Finalmente, ningún compuesto el compuesto 6 es diferente a las demás nitronas tratadas por lo que se concluye que estos compuestos tipo nitrona disminuyen la producción de nitritos por completo.

**TABLA N°25:** Test de Dunnett sobre la producción de nitritos por compuestos tipo nitrona con LPS 5 ng/mL.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
C-	3	0.71	A
C1	3	14.47	
C2	3	14.42	
C9	3	14.36	
C7	3	12.07	
C4	3	12.53	
C5	3	10.13	
C8	3	7.36	
C3	3	9.00	
C6	3	3.89	

Para corroborar si existe igualdad entre el control negativo y los compuestos tipo nitrona fue necesario realizar un test de Dunnett lo que comprobó que los compuestos tipo nitrona no son iguales al control negativo a un 95% de confianza.

#### 4. Análisis de varianza

Para poder comparar los resultados obtenidos y comprobar que los 3 ensayos no difieren entre si se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, para desarrollar este análisis estadístico se utilizaron los datos evaluados obtenidos al final del ensayo de cada grupo (media neta), por lo cual se tiene nueve datos por grupo, debido a que se experimentaron con nueve compuestos tipo nitrona diferentes cada uno de ellos estos datos se pueden observar en la Tabla 26.

**TABLA N°26:** Actividad antiinflamatoria, ensayo de producción de nitrito. (n=9)

LPS (ng/mL)	Concentración de nitritos ( $\mu\text{M}$ )								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
LPS 0.1	16.33	7.80	7.82	10.58	9.44	7.44	15.40	14.62	15.76
LPS 1	5.84	11.42	6.44	6.93	9.82	4.69	9.09	8.11	9.22
LPS 5	14.47	14.42	9.00	12.53	10.13	3.89	12.07	7.36	14.36

Los resultados del análisis de varianza se muestran en la tabla 27 donde se observa que el valor F experimental fue de 1.71095247 el cual es menor a valor de tablas de 2.5101579 por lo cual se llega a la conclusión de que ninguno de los grupos es diferente al 95% de confianza

**TABLA N°27:** Análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	142.0342	8	17.754275	1.71095247	0.16369618	2.5101579
<b>Dentro de los grupos</b>	186.783067	18	10.376837			
<b>Total</b>	328.817267	26				

Por lo que finalmente dados los resultados podemos inferir que los compuestos tipo nitrona evitan la activación de células RAW 264.7 gracias al posible mecanismo siendo este la formación de una trampa de spin la cual se encarga de captar a los radicales libres formados evitando la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, disminuyendo los mensajeros intracelulares y extracelulares encargados de la respuesta inflamatoria.



## CONCLUSIONES

1. Se logró determinar las concentraciones más adecuadas de lipopolisacárido para evaluar el efecto antiinflamatorio las cuales fueron 0.5, 1 y 5 ng/ml.
2. Se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos tipo nitrona en un modelo de células RAW 264.7 activadas por lipopolisacárido, llegando a la conclusión de que los compuestos tipo nitrona poseen actividad antiinflamatoria, evitando la producción de nitritos.
3. Se determinó que las nueve nitronas estudiadas poseen igual efecto antiinflamatorio ya que terminado los ensayos dieron las mismas concentraciones de nitrito, esto se comprobó con un análisis de varianza ANOVA donde se observó que a diferentes concentraciones de lipopolisacárido las nitronas poseen igual efecto antiinflamatorio.
4. Se determinó que los compuestos tipo nitrona no son tóxicos por medio de un test de viabilidad celular MTT, dando como resultado una viabilidad celular que está por encima del 90%

## SUGERENCIAS

Después de haber realizado el presente trabajo de investigación y habiendo surgido una variedad de temas de investigación, me permito hacer las siguientes sugerencias:

1. Realizar este proyecto con animales de experimentación para la obtención de datos más específicos en función a organismos vivos.
2. En base a estudios realizados sobre los compuestos tipo nitrona es necesario realizar una investigación acerca de la estabilidad de estos compuestos.
3. Continuar con la investigación de los compuestos tipo nitrona ya que puede presentar propiedades antiinflamatorias ocasionadas por diferentes patologías.
4. Sintetizar y a su vez estudiar nuevas nitronas.
5. Evaluar la toxicidad para los seres vivos de los compuestos tipo nitrona.

## REFERENCIAS

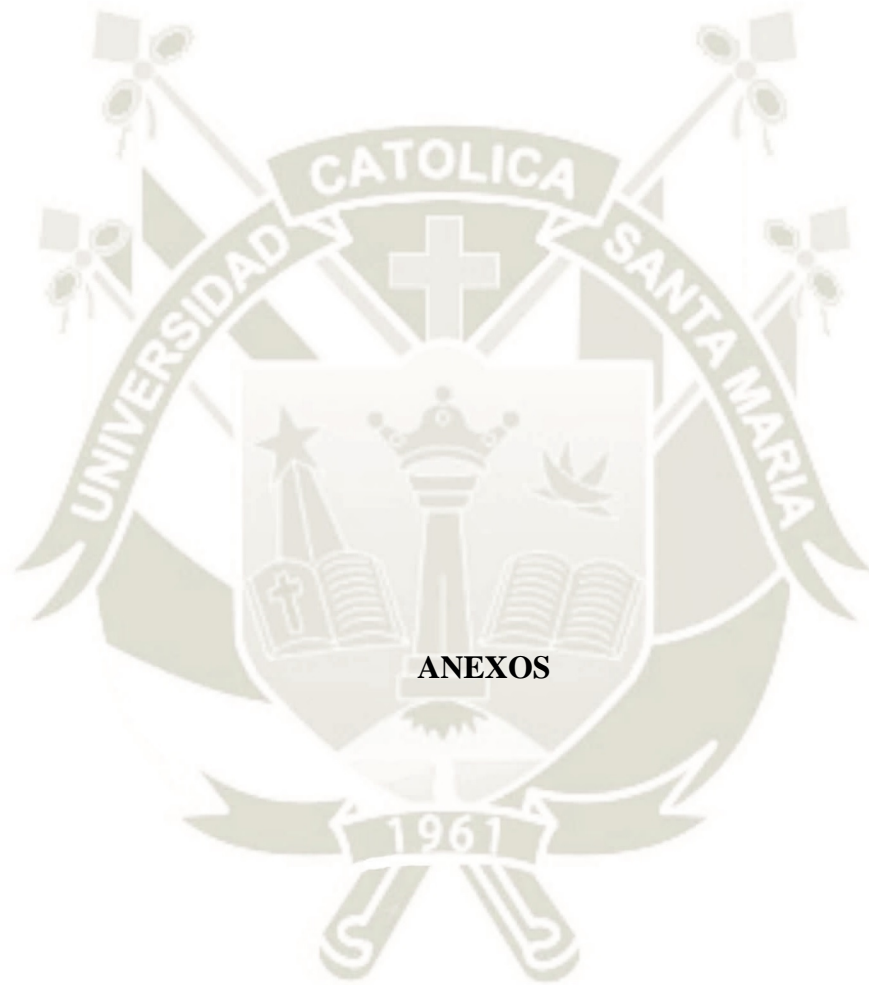
1. Sarkhel S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of Quillaja saponaria Mol. saponin extract in mice. *Toxicol Reports*. Elsevier Ireland Ltd; 2016; 3:1–3.
2. Manual Washington de terapéutica medica 35va edición, 2016.
3. Débora S. S. Costa, Paulo R. R. Costa, Ayres G. Dias. Nitrones: Occurrence in Nature, Synthesis, Chemical Reactivity and Biological Properties.
4. Halliwell B: Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995, 49(10):1341-1348.
5. Débora S. S. Costa, Paulo R. R. Costa, Ayres G. Dias. 2016. Nitrones: Occurrence in Nature, Synthesis, Chemical Reactivity and Biological Properties
6. Ramirez DC, Gómez-Mejiba SE, Mason RP: Immuno-spin trapping detection of DNA-centered radicals: development, validation and in vitro, ex vivo and in vivo Applications. *Free Radic Biol Med* 2004, 37(Suppl):111.
7. Floyd RA, Hensley K: Nitronone inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 899:222-237.
8. Floyd RA, Hensley K, Bing G: Evidence for enhanced neuro-inflammatory processes in neurodegenerative diseases and the action of nitrones as potential therapeutics. *J Neural Transm Suppl* 2000(60):387-414.
9. Floyd RA, Hensley K, Forster MJ, Kelleher-Anderson JA, Wood PL: Nitrones as neuroprotectants and antiaging drugs. *The New York Academy of Sciences* 2002, 959:321-329.
10. Floyd RA, Hensley K, Forster MJ, Kelleher-Anderson JA, Wood PL: Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging. *Mech Ageing Dev* 2002, 123(8):1021-1031.
11. Dario C. Gomez, Sandra E. The spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrrolineN-oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells.
12. M. C. Della Vedova, F. M. Soler Garcia, M. D. Muñoz, M. W. Fornes, Sandra E. Gomez Mejiba, N. N. Gómez, and Dario C. Ramirez. 2019. Diet-Induced Pulmonary Inflammation and Incipient Fibrosis in Mice: a Possible Role of Neutrophilic Inflammation.
13. Halliwell B: Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995, 49(10):1330-1338.

14. Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Mason RP: Immuno-spin trapping of DNA radicals. *Nat Methods* 2006, 3(2):123-127.
15. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1B generation. *Clin Exp Immunol.* 2006 nov; 147:227–35.
16. León Regal ML, Alvarado Borges A, De Armas García O, Miranda Alvarado, Varens Cedeño, Cuesta del Sol. Inflammatory Acute Response. *Biochemical and Cellular Considerations. Rev. Finlay.* 2015; 5(1): p. 47-62.
17. Mitchel Richard; Kumar Vinay; Abbas Abul; Fausto Nelson: Compendio de Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. 7ª Edición. Editorial Elsevier Saunders S.A. Madrid España. 2007.
18. Mohan Harsh: Patología. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2010.
19. Villena, Arroyo JL. Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract from *Oenothera rosea* (yawar socco) in rats with induction to acute and chronic inflammation. *Ciencias e Investigacion.* 2012; p. 15-19.
20. J.K. Yamamoto-Furusho, F. Bosques-Padilla, J. de-Paula, M.T. Galiano, P. Ibañez, F. Juliao, P.G. Kotze, J.L. Rocha, F. Steinwurz, G. Veitia, C. ZaltmanTrinchieri, Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation.
21. Villalba Herrera W. Inflamacion. *Act. Clin. Med.* 2014; p. 2261-2265.
22. Villena, Arroyo JL. Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract from *Oenothera rosea* (yawar socco) in rats with induction to acute and chronic inflammation. *Ciencias e Investigacion.* 2012; p. 15-19.
23. Jácobo D, Zúñiga G. Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico de la asociación del extracto de *Púnica granatum* "Granada" y *Plantago major* "Llanten" en animales de experimentación-Arequipa 2016. Tesis de grado. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2016.
24. Valencia P. Serrano C. "Inflamación Y Reparación Tisular" cap.5 pag.48-58. [file:///C:/Users/alum\\_bvcs/Downloads/Valencia\\_Patologia\\_1a\\_cap\\_muestra\\_05\\_INFLAMACION\\_Y\\_REPARACION\\_TISULAR.pdf](file:///C:/Users/alum_bvcs/Downloads/Valencia_Patologia_1a_cap_muestra_05_INFLAMACION_Y_REPARACION_TISULAR.pdf)
25. León M. *et al.* "Respuesta inflamatoria aguda, consideraciones bioquímicas y celulares" Universidad de Ciencias Médicas, Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba, CP: 55100. *Rev. Fac Med UCMC* Vol. 5 marzo 2015. <http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v5n1/rf06105.pdf>.

26. Libby P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutr Rev.* 2007;2007(2):140–6.
27. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. In: *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology.* EEUU: Elsevier; 2004. p. 385–405.
28. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol.* 1999;162(6):3256–62.
29. Ruiz Speare José; Barrón Vargas: *Aprenda Medicina sonriendo.* 2ª Edición. Editorial Alfil S.A. México. 2014.
30. Organización Mundial de la salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: OMS:2008. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/19789243506098\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/19789243506098_spa.pdf)
31. Vega G. Inmunología para el médico general “Inflamación” Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 51 No. 5 septiembre-octubre, 2008. <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085k.pdf>
32. Ruiz Speare José; Barrón Vargas: *Aprenda Medicina sonriendo.* 2ª Edición. Editorial Alfil S.A. México. 2014.
33. Abad B, Mesonero JE, Salvador MT, García-Herrera J, Rodríguez Yoldi MJ. (2001). The administration of lipopolysaccharide, in vivo, induces alteration in L-leucine intestinal absorption. *Life Sci.* 70: 615-628.
34. Beutler B, Rietschel ET. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol,* 3(2):169-76.
35. Bélanger M, Bégin C, Jacques M. (1995). Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun.* 63(2):656-62.
36. Akira, S. “Toll-like receptors: lessons from knockout mice”. *Biochem Soc. Trans.* 28. (2000): 551–556.
37. Abbas, Abul K. *Inmunología celular y molecular* 9 edición.
38. Berry DA, Cronin KA, Plevritis Sk, *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1784, 1792.
39. Wong ZW, Phillips SJ, Ellis MJ. Dramatic response of choroidal metastases from breast cancer to a combination of trastuzumab and vinorelbine. *Breast J* 2004; 10:54-56.

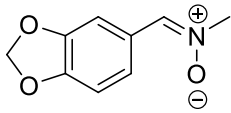
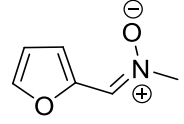
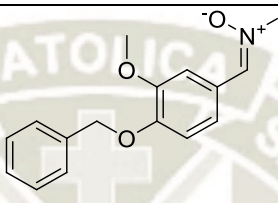
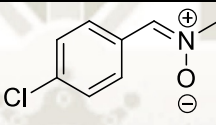
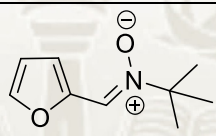
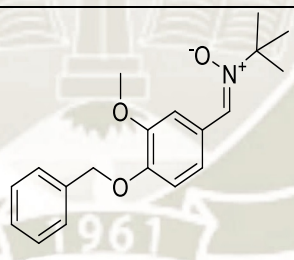
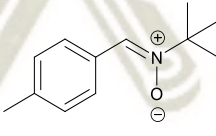
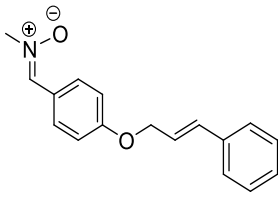
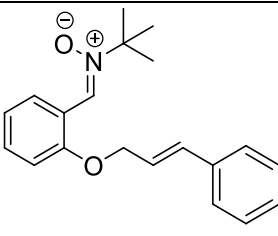
40. José Antonio reales calderón, estudio de la respuesta de macrófagos murino y humanos frente a *Candida albicans* utilizando diversas técnicas proteómicas, Universidad Complutense de Madrid, facultad de farmacia, departamento de microbiología II.
41. Ballard Dw, Dixon Ep, Peffer Nj, Bogerd h, Doerre S, Stein B, et al: The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. PNAS 1992; 89(5): 1875-1879.
42. Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, Behr Tm, Jung P, Angermann Ce, Et AL: Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. Cardiovasc Res 2003; 57(3): 749-756.
43. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor kappa B and cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2007;19(2):154-161.
44. Ghosh, S, May M, Kopp E. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of the immune response. Annu Rev Immunol 1998;16: 225-260
45. Bergmann Mw, Loser P, Dietz R, Harsdorf R: Effect of NF-κB inhibition on TNFα induced apoptosis and downstream pathway in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 1223-1232.
46. Nagano T. 1999. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14, 283-290.
47. Spreng D, N Sigrist, A Schweighauser, A Busato, P Schawalder. 2001. Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: Detection in urine, serum and synovial fluid specimens. *Vet Surg* 30, 191-199.
48. Kawai T, Akira S: Toll-like receptor activation in immunity vs. Tolerance. F. Cm, ed. *Frontiers in immunology, frontier research topics*, 2011.
49. Augusto O, Muntz Vaz S: epr spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. *Amino acids* 2007; 32:535-542.
50. Davies MJ: The oxidative environment and protein damage. *Biochim biophys acta* 2005; 1703:93-109.
51. Halliwell, Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. ET AL., 1984.
52. Janzen EG: Spin Trapping. *Methods enzymol* 1984; 105:188-1986.
53. Mason DY, Sammons RE: The labeled antigen method of immunoenzymatic staining. *J histochem cytochem* 1979; 27:832-840.
54. Guzmán Grenfell, Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial et al., 2006

55. Stefany Romero Hurtado, Carlos Arturo Iregui. Revista de Medicina Veterinaria N.º 19 / Enero - junio 2010.
56. Marta Miguel Castro, Elena Herrero Martínez, Desarrollo de técnicas de cultivos celulares, Universidad Nacional de Panamá.
57. María Antonia Dosal, Marcos Villanueva Marzo, Introducción a la metrología química, Curvas de calibración en los métodos analíticos, 2008.
58. Adarmes H, JP Solís, A Müller, M Galleguillos. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
59. Miller J, Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4th ed. Madrid: Madrid; 2002.
60. Mayra Fabiola López de la Torre. Estudio de la respuesta inmunológica celular obtenido al exponer células de ratones Balb/c a extractos del alga parda *Macrocystis pyrifera*. Ensenada Baja California. Diciembre 2010.
61. Saira Cancela. Estudio de nitronas como inhibidores de apoptosis en células neuronales. Facultad de Ciencias, Instituto de investigaciones Biológicas San Clemente Estable, Universidad de la República.
62. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas, Lina María Escobar M, Augusto Rivera, Fabio A. Aristizábal G., vitae, revista de la facultad de química farmacéutica ISSN 0121-4004, ISSNE 2145-2660. Volumen 17 número 1, año 2010. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Págs. 67-74
63. Adarmes H, JP Solís, A Müller, M Galleguillos. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
64. Wong ZW, Phillips SJ, Ellis MJ. Dramatic response of choroidal metastases from breast cancer to a combination of trastuzumab and vinorelbine. *Breast J* 2004; 10:54-56.
65. Immuno-spin trapping of protein and DNA radicals: “Tagging” free radicals to locate and understand the redox process, Sandra E. Gomez-Mejiba, Zili Zhai, Hammad Akram, Leesa J. Deterding, Kenneth Hensley, Nataliya Smith, Rheel A. Towner, Kenneth B. Tomer, Ronald P. Mason, Dario C. Ramirez.



ANEXO N°1

COMPUESTOS TIPO NITRONA

Descripción	Código de muestra	Estructura	Cantidad (mg)	Peso Molecular
C1	LQB-106		9,6	179,17
C2	LQB-109		15,2	125,05
C3	LQB-110		4,1	271,31
C4	LQB-122		15,7	169,60
C5	LQB-131		4,5	167,20
C6	LQB-134		2,5	313,39
C7	LQB-141		4,3	191,27
C8	LQB-467		5,5	267,32
C9	LQB-476		1,8	309,40

## ANEXO N°2

### Efecto del LPS y compuestos tipo nitrona sobre la viabilidad celular

Application: Tecan i-Control		Tecan i-Control, 1.4.5.0	
Device: infinite 200		Serial number: 802004558	
Firmware: V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16)		MAI, V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16)	
Date:	29/10/2019	0.5, 1, 5 ng/ml	5% Time: 3:49:35 PM
System:	PCFR70	User:	PCFR70\ramirezlab
Plate	Corning 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol [COS96ft.pdfx]		
Name: Viabilidad celular LPS y compuestos tipo nitrona			
Label: Label1			
Mode:	Absorbance	Wavelength:	550 nm Bandwidth: 9 nm
Number of Flashes:	25	Settle:	0 ms Start Time: 3:49:35 PM
Temperature: 37.2 °C			

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.9928	0.8885	0.7112	0.4792	0.2545	0.1493	0.1024	0.0045			
C		0.9980	0.8889	0.7108	0.4799	0.2498	0.1492	0.1026	0.0040			
D		0.9980	0.8883	0.7114	0.4794	0.2535	0.1494	0.1020	0.0042			
E		0.3545	0.9677	0.9271	0.9254	0.9432	0.9719	0.9568	0.9663	0.9853	0.9786	
F		0.3498	0.9735	0.9278	0.9295	0.9474	0.9768	0.9547	0.9725	0.9836	0.9713	
G		0.3535	0.9744	0.9274	0.9255	0.9475	0.9715	0.9514	0.9756	0.9893	0.9789	
H												

### ANEXO N°3

#### Ensayo de producción de nitrito compuestos tipo nitrona y compuestos tipo nitrona con LPS 0.5 ng/ml.

Application: Tecan i-Control		Tecan i-Control, 1.4.5.0	
Device: infinite 200		Serial number: 802004558	
Firmware: V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16) MAI, V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16)			
Date:	30/10/2019	5%	Time: 5:49:35 PM
System:	PCFR70	User:	PCFR70\ramirezlab
Plate	Corning 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol [COS96ft.pdfx]		
Name: nitritos compuestos tipo nitrona y LPS 0.5 ng/mL			
Label: Label1			
Mode:	Absorbance	Wavelength:	550 nm
Number of Flashes:	25	Settle:	0 ms
Temperature:	37.2 °C		
Bandwidth:		9 nm	
Start Time:		5:49:35 PM	

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.0829	0.0967	0.0945	0.0965	0.1018	0.0826	0.0914	0.098	0.0941	0.0932	
C		0.0821	0.0971	0.0961	0.0984	0.0904	0.0878	0.0871	0.0923	0.0903	0.0927	
D		0.0829	0.0919	0.0992	0.0925	0.1001	0.0854	0.0857	0.0940	0.0915	0.0920	
E		0.4634	0.1052	0.0897	0.0897	0.0945	0.092	0.0888	0.1012	0.1029	0.1009	
F		0.4731	0.1001	0.0884	0.0883	0.0921	0.0905	0.0873	0.0994	0.0930	0.1006	
G		0.4685	0.1007	0.0895	0.0897	0.0935	0.0925	0.0899	0.1012	0.1024	0.1019	
H												

## ANEXO N°4

### Ensayo de producción de nitrito compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL y 5 ng/mL

Application: Tecan i-Control		Tecan i-Control, 1.4.5.0	
Device: infinite 200		Serial number: 802004558	
Firmware: V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16) MAI, V_2.02_11/06_InfiniTe (Dec 13 2006/16.18.16)			
Date:	30/10/2019	5%	Time: 6:49:35 PM
System:	PCFR70	User:	PCFR70\ramirezlab
Plate	Corning 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol [COS96ft.pdfx]		
Name: nitritos compuestos tipo nitrona con LPS 1 ng/mL y 5 ng/mL			
Label: Label1			
Mode:	Absorbance	Wavelength:	550 nm
Number of Flashes:	25	Settle:	0 ms
Temperature:	37.2 °C	Bandwidth:	9 nm
			Start Time: 6:49:35 PM

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0.0829	0.0865	0.0965	0.0856	0.0851	0.0924	0.0823	0.0905	0.09	0.0915	
C		0.0821	0.0898	0.0917	0.0867	0.0884	0.0919	0.0863	0.0932	0.0908	0.0934	
D		0.0829	0.0825	0.0957	0.0892	0.0902	0.0924	0.085	0.0897	0.0882	0.0891	
E		0.8634	0.0992	0.0994	0.0896	0.096	0.0923	0.0841	0.0922	0.088	0.0981	
F		0.8731	0.0995	0.0983	0.0819	0.085	0.0925	0.0836	0.0966	0.089	0.0995	
G		0.8685	0.0989	0.0997	0.0935	0.0979	0.0933	0.0833	0.095	0.0886	0.0995	
H												

### ANEXO N°5

#### Incubación de células RAW 264.7

