

# Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato

## Effect of julocrotol, isojulocrotol and julocrotona on oxygen reactive species production in human leucocytes stimulated by phorbol myristate acetate

MICHAEL R MIJARES<sup>1,2</sup>, GRICELIS P MARTÍNEZ<sup>1,2</sup>, PERLA CHIRINOS<sup>2</sup>, ALÍRICA I SUÁREZ<sup>1</sup>, REINALDO S COMPAGNONE<sup>3</sup>, ZULEIMA BLANCO<sup>1</sup>, JUAN B DE SANCTIS<sup>2</sup>

### Resumen

Se evaluó el efecto antiinflamatorio y antioxidante de los alcaloides glutarimídicos: julocrotol, isojulocrotol y julocrotona aislados de la especie *Croton cuneatus*. Los compuestos no indujeron muerte celular en cultivos primarios de leucocitos humanos cuando la viabilidad fue evaluada por el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Todos los compuestos disminuyeron la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en leucocitos humanos activados por el acetato de forbol miristato (PMA) en una forma dependiente de la dosis, cuando éste fue evaluado a través de la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT). La julocrotona fue el compuesto más potente inhibiendo la producción del  $O_2^-$  con una  $CI_{50}$  de 10,21  $\mu M$ , mientras que el julocrotol y el isojulocrotol presentaron valores de  $CI_{50}$  de 16,19 y 25,13  $\mu M$ , respectivamente. Los tres alcaloides glutarimídicos fueron más potentes que la talidomida (análogo estructural). Ninguno de los alcaloides exhibió efecto antioxidante en el método del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Se concluye que julocrotol, isojulocrotol, y julocrotona, exhiben un potente efecto antiinflamatorio por lo que pueden ser considerados compuestos guías para el desarrollo de nuevas terapias.

**Palabras clave:** Inflamación, julocrotol, isojulocrotol, julocrotona, talidomida.

### Abstract

The anti-inflammatory and antioxidant effects of the glutarimide alkaloids julocrotol, isojulocrotol and julocrotona, purified from *Croton cuneatus*, were assessed. The compounds did not induce cell death in human leukocytes when they were analyzed by the MTT assay. The glutarimide alkaloids decreased superoxide anion production in human leukocytes in a dose dependent manner when this was evaluated by NBT reduction. Julocrotona was the most potent compound inhibiting superoxide production with an  $IC_{50}$  of 10.21  $\mu M$ ; on the other hand, the  $IC_{50}$  for julocrotol and isojulocrotol were 16.19 and 25.13  $\mu M$ , respectively. The three alkaloids were more potent than thalidomide (structural analog). None of the alkaloids had antioxidant properties assessed by the DPPH protocol. It is concluded that julocrotol, isojulocrotol, and julocrotona, exhibit a potent anti-inflammatory effect and consequently they may be considered to be leading compounds in the development of new therapies.

**Key words:** Inflammation, julocrotol, isojulocrotol, julocrotona, thalidomide.

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia.

<sup>2</sup> Instituto de Inmunología Facultad de Medicina.

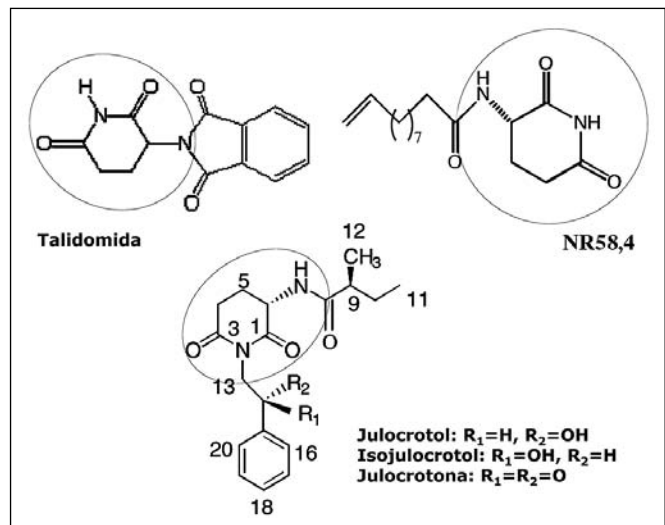
<sup>3</sup> Escuela de Química Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Dr. Michael Mijares. Cátedra de Análisis Farmacéutico. Facultad de Farmacia. UCV. michaelfarmacia@yahoo.es, Teléfono 0416 6275078, 6052700.

## Introducción

La inflamación es una respuesta inmune esencial que permite la supervivencia durante la infección o el daño a los tejidos, y que además mantiene la homeostasis en una importante variedad de condiciones nocivas (Libby, 2007; Medzhitov, 2010). La respuesta inflamatoria ocurre por diversos mecanismos incluyendo la biosíntesis de prostaglandinas, leucotrienos, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y citocinas proinflamatorias, a través de la activación de las ciclooxigenasa-2 (COX-2), la sintasa inducible del óxido nítrico (NOS-2), la activación de la vía NAD(P)H/PKC (proteína quinasa C), y la activación de factores transcripcionales como el factor nuclear kappa B (NF-κB) (Salvemini y col., 2006). Dentro del campo terapéutico de los antiinflamatorios se emplean algunas estrategias que involucran la inhibición de la enzima COX-2. Sin embargo, los fármacos disponibles en la actualidad del género COXIB, han sido asociados con efectos adversos gastrointestinales, cardiovasculares y renales de importancia (Zhang y col., 2006).

El descubrimiento de drogas obtenidas de plantas ha resultado en el desarrollo de fármacos antiinflamatorios, anticancerígenos, y antibióticos que aún se mantienen en el arsenal terapéutico. Por lo tanto, las plantas representan una importante fuente de nuevas drogas y compuestos guías (Itokawa y col., 2008; Gossau y col., 2011). Las plantas medicinales han sido usadas por mucho tiempo para el tratamiento de una considerable cantidad de enfermedades. Diversos estudios experimentales han aportado evidencias científicas que demuestran el efecto farmacológico de las plantas usadas en la medicina folclórica, que por tanto las convierte en un punto de partida en la búsqueda de nuevas terapias (Newman y Cragg, 2007; Sharafkhaneh y col., 2007). Estudios etnobotánicos reportan que diversas especies del género *Croton* son usadas por indígenas del Amazonas en forma de infusión para tratar los procesos inflamatorios, las heridas, y los desórdenes estomacales (Morales y Castillo, 2005). Los efectos antiinflamatorios y antiproliferativos de los extractos del *Croton cuneatus*, y otras especies de *Croton*, han sido mostrados previamente *in vitro* e *in vivo*, con extractos y compuestos purificados (Suárez y col., 2003, 2004, 2006, 2009). Mientras el extracto acuoso de *Croton cuneatus* disminuyó significativamente la inflamación plantar, inducida por la albúmina de suero bovino en ratas (Suárez y col., 2006), los alcaloides glutarimídicos, julocrotol, isojulocrotol y julocrotona aislados de esta especie (Figura 1) mostraron actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de carcinoma de mama humano (MCF-7) y sobre la línea celular de hepatoma humano (Hep-G2) (Suárez y col., 2004).



**Figura 1. Estructuras de los alcaloides glutarimídicos, la talidomida, y los inhibidores selectivos de quimiocinas (BSCIs). Se destaca en los tres grupos de compuestos la presencia del grupo 3-aminoglutarimida.**

Desde el punto de vista estructural, el grupo glutarimida está presente en un gran número de moléculas con un amplio rango de actividades farmacológicas. Dentro de éste grupo destacan la sesbanimida, la aminoglutetimida, el antineoplaston A10, los inhibidores selectivos de quimiocinas (BSCI) y la talidomida y sus análogos (Figura 1), que han mostrado potentes efectos antiinflamatorios y antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Corral y col., 1996; De Sanctis y col., 2010). La talidomida es una molécula análoga del ácido glutámico, que presenta el grupo 3-aminoglutarimida, al igual que los alcaloides glutarimídicos (Figura 1). La talidomida y la lenalidomida (IMiDs) han sido aprobadas por la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple y el síndrome mielodisplásico en humanos, y se encuentran en diversos estudios clínicos para el tratamiento de diversos cánceres humanos y enfermedades relacionadas con el proceso de inflamación (De Sanctis y col., 2010).

En un esfuerzo por identificar nuevos agentes antiinflamatorios, el presente estudio fue llevado a cabo para evaluar el efecto de los alcaloides glutarimídicos, julocrotol, isojulocrotol, y julocrotona extraídos de *Croton cuneatus*, en modelos de inflamación en células humanas, así como su posible efecto antioxidante.

## Materiales y métodos

### AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

Los alcaloides glutarimídicos, julocrotol, isojulocrotol y julocrotona (Figura 1), fueron aislados de *Croton cuneatus* por Suárez y col., 2004. Las soluciones stock de los alcaloides glutarimídicos y la quercetina fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO) seco y estéril a

una concentración de 0,1 M. La concentración final de DMSO nunca fue mayor a 0,1% m/v.

#### PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN DE LOS LEUCOCITOS HUMANOS

Los leucocitos de la sangre venosa heparinizada de sujetos sanos, fueron separados de los eritrocitos por medio de la lisis de los últimos, con una solución tampón hipertónica, constituida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y EDTA como fue descrito previamente por Lehmann y col., 1997. Brevemente, dos mililitros de sangre heparinizada fueron colocados en tubos cónicos de 50 mL. Seguidamente fue adicionada solución de lisis 1X, hasta completar los 50 mL. Luego se procedió a agitar durante 10 minutos, al cabo de los cuales los tubos fueron centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron descartados, y los botones celulares fueron dispersados, y resuspendidos en 50 mL de Buffer Fosfato (PBS) con 0,1% m/v gel (PBS gel). Inmediatamente se procedió a centrifugar en las condiciones anteriores por 10 minutos adicionales, y este procedimiento de lavado fue repetido en otras dos oportunidades, una a 1200 rpm, y finalmente a 900 rpm para eliminar el exceso de plaquetas. Los leucocitos totales fueron resuspendidos en 10 mL de PBS gel, contados en una cámara de Neubauer con azul de tripano, y la suspensión fue ajustada con PBS gel a la concentración deseada.

#### ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR: MÉTODO DEL MTT

Para ensayar la viabilidad celular se empleo el método colorimétrico del MTT, debido a su sencillez y reproducibilidad. La sal de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), es un compuesto de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenadas presentes en las mitocondrias activas de células viables, produciendo cristales de formazán azul oscuro insolubles en medio acuoso (Mossman y col., 1983).

Los leucocitos humanos fueron sembrados en placas de 96 pozos y tratados con concentraciones crecientes de los compuestos de interés durante 2h. Al finalizar el tiempo de incubación, las placas fueron centrifugadas, los sobrenadantes retirados cuidadosamente, y luego fueron adicionados 50 mL de una disolución de MTT (0,4 mg/mL en PBS) a cada pozo e incubados a 37°C por 4 horas adicionales. Finalizada la incubación, las placas fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 minutos, luego se retiró cuidadosamente el sobrenadante, y los cristales de formazán fueron disueltos con 100 mL de DMSO, agitados por 10 minutos y la magnitud de la reducción del MTT fue cuantificada por

la medición de la absorbancia a 540 nm en lector de microplacas de ELISA.

#### ENSAYO DE LA REDUCCIÓN DEL AZUL DE NITRO-TETRAZOLIO (NBT)

El ensayo del NBT ha sido ampliamente utilizado para medir aniones superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) liberados por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos durante el estallido oxidativo (Choi y col., 2006; Schopf y col., 1984). El NBT es un ditetrazolio aromático, nitro sustituido, soluble en agua que reacciona con los  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para formar un derivado de diformazán reducido que puede ser monitoreado espectrofotométricamente. La reducción del NBT al compuesto de diformazán insoluble en medio acuoso sirve como un marcador de la capacidad redox de los fagocitos estimulados, reflejando la actividad de la NAD(P)H oxidasa dependiente de la PKC (Esfandiari y col., 2003).

El ensayo fue ejecutado de acuerdo a la técnica ideada por Rook y col., 1985, para leer el NBT reducido en microplacas de ELISA, con las adaptaciones de Rainard, 1986. En placas de 96 pozos,  $2 \times 10^5$  células fueron tratadas durante 1h (37°C, 95% aire/ 5% de  $\text{CO}_2$ ) con los alcaloides glutarimídicos, la talidomida, la quercetina o vehículo. Finalizada la incubación, se adicionó a todos los pozos 50  $\mu\text{L}$  de solución que contenía, 1,5 mg/mL NBT y 500 ng/mL de PMA (para una concentración final por pozo de 100ng/mL). Después de 1 hora adicional a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ , las placas fueron centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos (a 4°C), posteriormente los sobrenadantes fueron retirados cuidadosamente y se procedió a lavar los pozos en 2 oportunidades con 200  $\mu\text{L}$  de PBS, y en una oportunidad con 200  $\mu\text{L}$  de metanol puro, para eliminar completamente el NBT no reducido. Las placas fueron secadas con aire, y el diformazán fue disuelto por la adición de 100  $\mu\text{L}$  de KOH 2M para lisar las membranas celulares, seguido por la adición de 160  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver los cristales de diformazán. Las placas fueron agitadas durante diez minutos, y la absorbancia de la solución azul turquesa fue leída en un lector de microplacas a 620 nm. Finalmente, los valores de absorbancia de los blancos fueron restados a los pozos remanentes, y se calculó el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT respecto a los controles. Las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ) de los compuestos fue determinada utilizando una regresión no lineal utilizando el programa Graphpad Prism versión 5.03.

#### ACTIVIDAD CAPTADORA DEL 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZIL (ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE)

La actividad captadora de radicales del DPPH para

los alcaloides glutarimídicos, fue realizada de acuerdo al método de Chiang y col., 2004. En microplacas de 96 pozos, 20  $\mu\text{L}$  de las soluciones acuosas de los compuestos (10x) ó 20  $\mu\text{L}$  de agua desionizada (control y blanco) fueron mezclados con 50 $\mu\text{L}$  del buffer Tris-HCl (pH 7,4) y 130  $\mu\text{L}$  de una solución etanólica del DPPH 115,38  $\mu\text{M}$  (concentración final en el pozo de 75 $\mu\text{M}$ ). Las placas fueron agitadas de forma continua durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, y la absorbancia fue leída inmediatamente a 540 nm. Después de restar el blanco a todos los pozos, los valores de absorbancia en presencia del tratamiento con los compuestos fueron expresados en términos del porcentaje de la absorbancia de los pozos control. El ácido ascórbico y la quercetina fueron utilizados como controles positivos en virtud de su poderosa actividad antioxidante.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados en al menos con cuatro réplicas. Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. La significancia estadística de los datos fue determinada a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la prueba de comparaciones múltiples post hoc de Dunnett,  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ), acompañadas por sus respectivos límites de confianza 95%, fueron determinadas por una regresión no-lineal de los experimentos individuales. Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism version 5.03 para Windows.

## Resultados

### EFECTO DE LOS ALCALOIDES GLUTARIMÍDICOS, SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS LEUCOCITOS HUMANOS TOTALES

La evaluación de la viabilidad celular de los alcaloides glutarimídicos y la talidomida sobre los leucocitos humanos fue determinada por el método del MTT. A las concentraciones ensayadas de los alcaloides glutarimídicos (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) y de la talidomida (0,1-250  $\mu\text{M}$ ), ninguno de estos compuestos tuvo efecto significativo sobre la reducción mitocondrial del MTT (Tabla I). Para el julocrotol, el isojulocrotol, y la julocrotona se observó que a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  hubo un ligero aumento de la viabilidad que no fue significativamente diferente de las células control (Tabla I).

### EFECTO DE LOS ALCALOIDES GLUTARIMÍDICOS Y LA TALIDOMIDA, SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL $\text{O}_2^{\cdot-}$ EN LEUCOCITOS HUMANOS ESTIMULADOS CON EL PMA (ROS EXTRACELULARES)

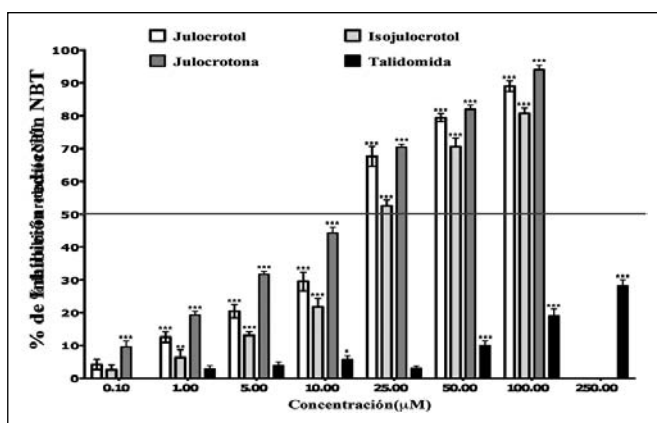
En los leucocitos humanos estimulados con el PMA, el tratamiento con el julocrotol, el isojulocrotol y la julocrotona generó una disminución significativa en la reducción del NBT respecto a los controles (Figura 2). Todos los compuestos exhibieron un efecto modulador de la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en una forma dependiente de la dosis. Las concentraciones más altas que fueron ensayadas del julocrotol, el isojulocrotol y la julocrotona (50 y 100  $\mu\text{M}$ ), redujeron la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en más de 70% (Figura 2), mientras que el efecto máximo de la talidomida fue 28,19% de inhibición a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  (Figura 2 y Tabla II). A la

Tabla I

### Efecto del julocrotol, el isojulocrotol, la julocrotona y la talidomida, sobre la viabilidad de los leucocitos humanos estimulados con PMA

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	% con respecto al control			
	Julocrotol	Isojulocrotol	Julocrotona	Talidomida
0,1	102,79 $\pm$ 1,71	102,37 $\pm$ 1,22	99,01 $\pm$ 2,10	-----
1	101,27 $\pm$ 1,99	103,35 $\pm$ 2,10	100,83 $\pm$ 3,97	102,44 $\pm$ 1,98
5	101,06 $\pm$ 0,42	101,96 $\pm$ 2,51	107,52 $\pm$ 1,77	100,90 $\pm$ 2,70
10	114,23 $\pm$ 0,82	101,61 $\pm$ 1,40	113,04 $\pm$ 1,49	98,71 $\pm$ 2,17
25	118,60 $\pm$ 5,33	108,89 $\pm$ 1,82	120,68 $\pm$ 2,99	102,13 $\pm$ 3,93
50	112,50 $\pm$ 1,11	105,32 $\pm$ 2,00	106,87 $\pm$ 2,87	100,04 $\pm$ 2,24
100	105,04 $\pm$ 1,20	100,78 $\pm$ 2,30	104,50 $\pm$ 2,56	103,64 $\pm$ 2,41
250	-----	-----	-----	102,07 $\pm$ 3,18

Los valores presentados representan los porcentajes con respecto al control (100%), siendo los promedios  $\pm$  SD para un N=6.



**Figura 2. Efecto de los alcaloides glutarimídicos y la talidomida sobre la producción del  $O_2^{\cdot-}$  en los leucocitos humanos estimulados con el PMA. Los leucocitos fueron pretratados según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan los valores promedios  $\pm$  SD (N=6); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control estimulado con el PMA.**

concentración de 100  $\mu$ M, el julocrotol, el isojulocrotol, y la julocrotona, fueron 4,69; 4,25; y 4,95 veces más potentes que la talidomida inhibiendo la producción del  $O_2^{\cdot-}$ . Así mismo, la julocrotona exhibió la mayor potencia con una  $CI_{50}$  de 10,21  $\mu$ M (9,08-11,47) (Tabla II). El orden de actividad para la inhibición de la producción del  $O_2^{\cdot-}$  fue: julocrotona > julocrotol > isojulocrotol >> talidomida.

Tabla II

**Valores de las concentraciones inhibitorias medias de los alcaloides glutarimídicos y la talidomida, sobre la producción del anión superóxido en leucocitos humanos estimulados con el PMA**

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
Julocrotol	<b>16,19</b> (14,80-17,72)
Isojulocrotol	<b>25,13</b> (23,74-26,59)
Julocrotona	<b>10,21</b> (9,08-11,47)
Talidomida	<b>&gt;250</b> (28,19 <sup>a</sup> )
Quercetina	<b>14,54</b> (10,85-18,23)

La producción del  $O_2^{\cdot-}$  fue determinada por la reducción del NBT. Los datos representan la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y el intervalo de confianza del 95%. N=6 (a= porcentaje de inhibición a 250  $\mu$ M).

#### EFFECTO DE LOS ALCALOIDEOS GLUTARIMÍDICOS SOBRE LA CAPTACIÓN DEL RADICAL LIBRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH) (EFFECTO ANTIOXIDANTE)

La actividad captadora de radicales libres de los alcaloides glutarimídicos y la talidomida fue estimada por la reactividad con el radical estable DPPH. El julocrotol, el isojulocrotol, la julocrotona, y la talidomida

no mostraron una significativa actividad antioxidante o actividad captadora de radicales libres en todo el rango de concentraciones evaluadas. Mientras que la quercetina y el ácido ascórbico (utilizados como controles positivos) exhibieron una potente actividad antioxidante con valores de  $CI_{50}$  de 6,14 y 10,65  $\mu$ M, respectivamente (Tabla III).

Tabla III

**Valores de las concentraciones inhibitorias medias del julocrotol, el isojulocrotol, la julocrotona y la talidomida sobre la captación del radical DPPH**

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
Julocrotol	> 200 (10,17%)
Isojulocrotol	> 200 (13,38%)
Julocrotona	> 200 (12,11%)
Talidomida	> 200 (1,88%)
Ácido ascórbico	<b>10,65</b> (9,65-11,75)
Quercetina	<b>6,14</b> (5,49-6,88)

Los datos representan la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y el intervalo de confianza del 95%. N=4. Para  $CI_{50} > 200$   $\mu$ M, los valores entre paréntesis representan el porcentaje de captación del DPPH a 200  $\mu$ M o 500  $\mu$ M en el caso de la talidomida.

## Discusión

Hay un importante cúmulo de evidencia que muestra que la producción de especies reactivas de oxígeno tales como el  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$ , el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) y el peroxinitrito se encuentran en el sitio de la inflamación y contribuyen al daño al tejido (Cuzzocrea y col., 2004; Mitra y Abraham, 2006; Salvemini y col., 2006). El radical  $O_2^{\cdot-}$  es producido por las oxidasas del NAD(P)H en neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células endoteliales y vasculares, entre otras, lo que puede llevar a efectos tóxicos, cuando son producidos en altos niveles durante el estallido oxidativo (Guzik y col., 2003). En la inflamación aguda y crónica, la producción del  $O_2^{\cdot-}$  se incrementa en una proporción que supera la capacidad de la enzima endógena superóxido dismutasa (SOD) para removerlo. El desbalance resulta en los daños mediados por el  $O_2^{\cdot-}$  (Salvemini y col., 2006). Algunos de los efectos que ejerce el  $O_2^{\cdot-}$  en la inflamación incluyen el daño a las células endoteliales, un incremento en la permeabilidad microvascular, la formación de factores quimiotácticos tales como el leucotrieno B4, la peroxidación lipídica, además de la oxidación y daño a la cadena simple del ADN (Fantone y Ward, 1982; Guzik y col., 2003). De este modo, las sustancias que atrapan estas especies reactivas de oxígeno, o disminuyan su producción, pueden modular el proceso inflamatorio.

Nuestros resultados mostraron, a través del ensayo de la reducción del NBT, que los alcaloides glutarimídicos inhibieron significativamente la producción del  $O_2^{\cdot-}$  en los leucocitos humanos estimulados con el PMA (Figura 2 y Tabla II). La julocrotona inhibió de forma potente la producción del  $O_2^{\cdot-}$  con un  $CI_{50}$  de 10,21 mM (Tabla II), siendo más activo que el julocrotol y hasta 2,5 veces más activo que el isojulocrotol. Ninguno de los alcaloides glutarimídicos afectó de forma significativa la viabilidad de los leucocitos humanos (Tabla I), lo que sugiere que la disminución de la producción del  $O_2^{\cdot-}$ , no fue una consecuencia de efectos citotóxicos directos de estos compuestos. Debido a que los alcaloides glutarimídicos mostraron una poderosa inhibición de la producción de ROS, nosotros evaluamos si la actividad antioxidante era responsable de la disminución del  $O_2^{\cdot-}$ . Se demostró, que ninguno de los alcaloides glutarimídicos o la talidomida exhibieron una actividad captadora de radicales libres incluso a la concentración de 200 mM (Tabla III). De este modo, no parece que estos compuestos puedan actuar como antioxidantes o captadores de radicales libres (al menos en un sistema libre de células). Por ello, se puede sugerir que el efecto inhibitorio de la producción del  $O_2^{\cdot-}$  por los alcaloides glutarimídicos en los leucocitos estimulados, podría estar mediado por una inhibición directa de algunas de las enzimas de la cascada de señalización de la PKC/NAD(P)H oxidasa, que es activada en PMN humanos al ser estimulados por el PMA y otros ésteres de forbol (Nixon y McPhail, 1999).

Las diferencias estructurales entre los tres alcaloides glutarimídicos podrían estar detrás de la diferencia en los efectos biológicos de estos compuestos. Por ejemplo, la presencia de un grupo ceto en el carbono 14 de la julocrotona, respecto a una función alcohólica para el julocrotol y el isojulocrotol en la misma posición (Figuras 1), hace que el primero de estos tres compuestos sea más activo que los dos últimos inhibiendo la producción del  $O_2^{\cdot-}$  (Tabla II). La estereoquímica del carbono 14 en el julocrotol e isojulocrotol, también tiene un ligero efecto sobre la reducción del NBT. El julocrotol (C-14(S)), es un inhibidor más potente de la producción del  $O_2^{\cdot-}$ , cuando es comparado con su isómero configuracional isojulocrotol (C-14(R)) (Figura 1). Un efecto similar ha sido descrito previamente para la talidomida y los BSCIs (análogos estructurales de los alcaloides glutarimídicos a través del grupo 3-amino-glutarimida). En el caso de los compuestos BSCIs, los isómeros S resultaron más potentes como inhibidores de quimiocinas de amplio espectro e inhibidores de TNF- $\alpha$  (Fox y col., 2002). Por otro lado, en las hPBMCs, el enantiómero -(S) de la talidomida fue significativamente más activo que el enantiómero -(R), inhibiendo la producción de TNF- $\alpha$  (Wnendt y col., 1996).

Se ha demostrado que la talidomida tiene un efecto supresor de la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  e hidroxilo, lo cual puede consecuentemente proteger del daño al tejido (Barnhill y col., 1984). Los resultados indican que la talidomida a concentraciones terapéuticas ejerce, al menos en parte, sus efectos antiinflamatorios por interferir con la generación de ROS dependiente de PMN, y de este modo protege a las células de los efectos citotóxicos de estos mediadores (Faure y col., 1980; Miyachi y col., 1982). La talidomida y sus derivados inmunomoduladores con el grupo 3-amino-glutarimida (pomalidomida y lenalidomida) han mostrado un poderoso efecto antiinflamatorio y anticancerígeno en diversos modelos en animales y en ensayos clínicos en humanos (Ossandon y col., 2002). Estas características convierten al julocrotol, el isojulocrotol y la julocrotona como promisorios compuestos guías para el tratamiento de patologías relacionadas al proceso inflamatorio y el cáncer. De los resultados del presente estudio se desprende que la mayor potencia inhibitoria de la producción de ROS de los alcaloides glutarimídicos vs la talidomida, presupone el uso de estos compuestos como potenciales agentes antiinflamatorios en patologías donde la talidomida (relacionada estructuralmente con el julocrotol, el isojulocrotol, y la julocrotona) ha mostrado un potencial uso terapéutico.

En conclusión, el presente estudio mostró que los alcaloides glutarimídicos julocrotol, isojulocrotol y julocrotona exhibieron propiedades antiinflamatorias *in vitro*. Estos compuestos disminuyeron poderosamente la producción del  $O_2^{\cdot-}$  en leucocitos humanos estimulados, sin afectar la viabilidad celular. La inhibición de la producción de ROS, en células humanas, por el julocrotol, el isojulocrotol, y la julocrotona podrían explicar, al menos en parte, los efectos beneficiosos de *Croton cuneatus* en la medicina tradicional para el tratamiento de la inflamación, así como los potentes efectos antiinflamatorios observados en modelos de inflamación *in vivo* con extractos obtenidos de esta especie (Suárez y col., 2006). Estudios adicionales deben ser realizados para determinar el efecto *in vivo* de estos compuestos en modelos de inflamación aguda y crónica en animales de experimentación.

## Agradecimientos

Financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), proyecto PI-06-00-5931-2005. Al Instituto de Inmunología y la Facultad de Farmacia-UCV.

## Referencias bibliográficas

- Barnhill RL, Doll NJ, Millikan LE, Hastings RC. 1984. Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Am Acad Dermatol* 11: 814-819.

- Choi H, Kim J, Cha Y, Kim C. 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem* 27: 31-44.
- Chiang Y, Chuang D, Wang S, Kuo Y, Tsai P, Shyur L. 2004. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J Ethnopharmacol* 95: 409-419.
- Corral LG, Muller GW, Moreira AL, Chen Y, Wu M, Stirling D, Kaplan G. 1996. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity *Mol Med* 2: 506-515.
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Ndengele M, Salvemini D. 2004. Superoxide-related signaling cascade mediates nuclear factor-kappaB activation in acute inflammation. *Antioxid. Redox Signal* 6: 699-704.
- De Sanctis JB, Mijares M, Suárez A, Compagnone R, Garmendia J, Moreno D, Salazar-Bookaman M. 2010. Pharmacological properties of thalidomide and its analogues. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 4: 144-148.
- Esfandiari N, Sharma R, Saleh R, Thomas A, Agarwal A. 2003. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl* 24: 862-870.
- Fantone JC, Ward PA. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 395-418.
- Faure M, Thivolet J, Gaucherand M. 1980. Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. *Arch Dermatol Res* 269: 275-280.
- Fox D, Reckless J, Warren S, Grainger D. 2002. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of N-acyl-3-aminoglutarimides as broad-spectrum chemokine inhibitors in vitro and anti-inflammatory agents in vivo. *J Med Chem* 45: 360-370.
- Gossiau A, Li S, Ho CT, Chen KY, Rawson NE. 2011. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol Nutr Food Res* 55: 74-82.
- Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 469-487.
- Itokawa H, Morris-Natschke SL, Akiyama T, Lee KH. 2008. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med* 62: 263-280.
- Lehmann A, Halstensen A, Holst J, Bassoe C. 1997. Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis. *J Immunol Method* 200:55-68.
- Libby P. 2007. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 65: S140-S146.
- Medzhitov R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140:771-776.
- Mitra S, Abraham E. 2006. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim Biophys Acta* 1762: 732-741.
- Morales T, Castillo A. 2005. Catálogo dendrológico comentado del bosque ribereño de la confluencia de los Ríos Cuao-Sipapo (estado Amazonas, Venezuela). *Acta Bot Venez* 28: 63-88.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Miyachi Y, Ozaki M, Uchida K, Niwa Y. 1982. Effects of thalidomide on the generation of oxygen intermediates by zymosan-stimulated normal polymorphonuclear leukocytes. *Arch Dermatol Res* 274: 363-367.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461-477.
- Nixon JB, McPhail LC. 1999. Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NAD(P)H oxidase. *J Immunol* 163: 4574-4582.
- Ossandon A, Cassarà EA, Priori R, Valesini G. 2002. Thalidomide: focus on its employment in rheumatologic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20: 709-718.
- Rainard P. 1986. A colorimetric microassay for opsonins by reduction of NBT in phagocytosing bovine polymorphs. *J Immunol Methods* 90:197-201.
- Rook G, Steele J, Umar S, Dockrell H. 1985. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by g-Interferon. *J Immunol Methods* 82: 161-167.
- Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S. 2006. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans* 34: 965-970.
- Schopf R, Mattar J, Meyenburg W, Scheiner O, Hammann K, Lemmel E. 1984. Measurement of respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. *J Immunol Methods* 67: 109-117.
- Sharafkhaneh A, Velamuri S, Badmaev V, Lan C, Hanania N. 2007. The potential role of natural agents in treatment of airway inflammation. *Ther Adv Respir Dis* 1: 105-120.
- Suárez AI, Chavez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares MR, De Sanctis JB. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Commun* 4: 1547-1550.
- Suárez A, Blanco Z, Compagnone R, Salazar M, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 105: 99-101.
- Suárez A, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone R, Arvelo F. 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat Prod Res* 18: 421-426.
- Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malmabo* bark aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 88: 11-14.
- Wnendt S, Finkam M, Winter W, Ossig J, Raabe G, Zwinger K. 1996. Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality* 8: 390-396.
- Zhang J, Ding EL, Song Y. 2006. Adverse effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on renal and arrhythmia events: Meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 296: 1619-1632.