



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

## **Técnicas de evaluación de la actividad antiinflamatoria “in vitro” y su aplicabilidad a plantas medicinales**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autora:

Jessica Leticia Cisneros Ortiz

CI: 060542837-4

Correo electrónico: jessy1996\_cisneros@hotmail.com

Tutora:

Dra. María Eugenia Peñaherrera Wilches  
Mgt

CI: 0102452075

**Cuenca, Ecuador**

05-Mayo-2021



## RESUMEN:

Las enfermedades inflamatorias constituyen un problema importante de salud pública, ya que afectan a más del 80% de la población mundial, por lo que ha crecido el interés científico de descubrir y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas de origen vegetal que sean más efectivas y que causen menos reacciones adversas. Debido a que las plantas han sido utilizadas tradicionalmente por sus propiedades medicinales y son fuentes importantes de moléculas que pueden presentar actividad farmacológica antiinflamatoria y tomando en cuenta que para iniciar una investigación científica es necesario aplicar ensayos “*in vitro*”, el objetivo del presente estudio fue analizar la literatura científica disponible de las técnicas “*in vitro*” que valoran la actividad antiinflamatoria y su aplicabilidad en productos naturales, a través de una revisión sistematizada. La búsqueda de la información fue en documentos y artículos originales en las bases de datos de Pubmed, Scielo, Sciencedirect, Medline, Elsevier, y Google académico en idioma inglés y español, empleando palabras claves como “antiinflammatory activity”, “*in vitro*”, “extractos vegetales”, “plantas medicinales” además se emplearon operadores booleanos como AND, y OR. La ecuación de búsqueda fue: (“antiinflammatory activity” OR “anti inflammatory activity”) AND (“*in vitro*”), la misma fue utilizada en cada una de las bases digitales. Se recuperaron un total de 1255 publicaciones en la búsqueda inicial y al aplicar criterios de exclusión y descartar los artículos duplicados, finalmente se seleccionaron 100 artículos, de los cuales se analizó las ventajas y desventajas de la técnica aplicada, la planta medicinal o los extractos utilizados y los metabolitos identificados, esta información fue resumida en tablas que están descritas en el presente trabajo. De acuerdo a esta revisión las técnicas más encontradas en los artículos fueron la inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos, seguido de la técnica de estabilización de la membrana eritrocitaria y el ensayo de la inhibición de la desnaturalización de proteínas. Por otra parte, todos los extractos vegetales analizados presentaron cierto grado de actividad antiinflamatoria independientemente de la técnica aplicada.

**Palabras claves:** Actividad antiinflamatoria. Inflamación. Técnicas antiinflamatorias.  
*In vitro*.

**ABSTRACT:**

Inflammatory diseases constitute an important public health problem, since they affect more than 80% of the world's population, which is why scientific interest has grown to discover and develop new therapeutic strategies of plant origin that are more effective and cause less adverse reactions. Because plants have traditionally been used for their medicinal properties and are important sources of molecules that may have anti-inflammatory pharmacological activity and taking into account that to initiate scientific research it is necessary to apply "*in vitro*" tests, the objective of this study was to analyze the available scientific literature on "*in vitro*" techniques that assess anti-inflammatory activity and its applicability in natural products, through a systematic review. The information search was in original documents and articles in the databases of Pubmed, Scielo, Sciencedirect, Medline, Elsevier, and academic Google in English and Spanish, using keywords such as "anti-inflammatory activity", "in vitro", "Plant extracts", "medicinal plants" in addition, Boolean operators such as AND, and OR were used. The search equation was: ("anti-inflammatory activity" OR "anti-inflammatory activity") AND ("in vitro"), it was used in each of the digital databases. A total of 1255 publications were retrieved in the initial search and by applying exclusion criteria and discarding duplicate articles, finally 100 articles were selected, of which the advantages and disadvantages of the applied technique, the medicinal plant or the extracts used were analyzed. and the identified metabolites, this information was summarized in tables that are described in the present work. According to this review, the techniques most found in the articles were the inhibition of NO production in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharides, followed by the erythrocyte membrane stabilization technique and the protein denaturation inhibition assay. On the other hand, all the analyzed plant extracts showed a certain degree of anti-inflammatory activity regardless of the applied technique.

**Keywords:** Anti-inflammatory activity. Inflammation. Anti-inflammatory techniques, *In vitro*.



## ÍNDICE DEL TRABAJO

### Contenido

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTO .....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
Objetivos.....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos.....	17
CAPITULO I.....	18
1. INFLAMACIÓN.....	18
1.1. PROCESO INFLAMATORIO.....	18
1.2.1. Cambios Vasculares.....	19
1.1.1.1. Vasodilatación y liberación de mediadores de la inflamación.....	19
1.1.1.2. Aumento de la permeabilidad vascular.....	19
1.1.2. Células que participan en el proceso inflamatorio.....	20
1.1.2.1. Mastocitos (Mas) .....	20
1.1.2.2. Basófilos .....	21
1.1.2.3. Eosinófilos .....	21
1.1.2.4. Plaquetas .....	22
1.1.2.5. Fibroblastos.....	22
1.1.3. Acontecimientos celulares.....	22
1.1.3.1. Reclutamiento y activación de los leucocitos .....	22
1.1.3.2. Marginación y rodamiento.....	23
1.1.3.3. Adhesión y transmigración.....	23
1.1.3.4. Quimiotaxis.....	24
1.1.3.5. Activación de los leucocitos .....	25
1.1.3.6. Fagocitosis .....	25
1.1.3.7. Destrucción y degradación de los microbios.....	25
1.2. FORMACIÓN DE EICOSANOIDES .....	27



1.2.1.	Vía de la ciclooxigenasa .....	27
1.2.2.	Vía de la lipoxigenasa.....	28
1.3.	MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN .....	29
1.3.1.	Mediadores preformados .....	29
1.3.2.	Mediadores de síntesis “ <i>de novo</i> ” .....	29
1.4.	RESOLUCIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO .....	31
1.4.1.	Cicatrización.....	31
1.4.2.	Fibrosis .....	32
CAPITULO II.....		33
2. PRUEBAS “ <i>IN VITRO</i> ” QUE EVALÚAN LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.		33
.....		33
2.1.	ENSAYO DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA .....	33
2.2.	INHIBICIÓN DE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	36
2.3.	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LIPOOXIGENASA.....	37
2.4.	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA .....	41
2.5.	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS PRO- INFLAMATORIAS .....	44
2.6.	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA .....	46
2.7.	INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA.	51
2.8.	INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADA CON LIPOSACÁRIDOS (LPS) .....	53
2.9.	INHIBICIÓN DE LA ELASTASA.....	55
2.10.	INHIBICIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $\alpha$ INDUCIDO POR EL FACTOR NUCLEAR KAPPA B .....	58
2.11.	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1. ....	59
CAPÍTULO III .....		62
3.	METODOLOGÍA .....	62
3.1.	Diseño y tipo de estudio.....	62
3.2.	Estrategia de búsqueda.....	62
3.3.	Evaluación. ....	62
	Criterios de inclusión: .....	62
	Criterios de exclusión:.....	63
3.4.	Análisis de la información: .....	63
RESULTADOS .....		64
Jessica Leticia Cisneros		5



CONCLUSIONES.....	135
RECOMENDACIONES .....	136
BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS .....	137
ANEXOS .....	151



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mediadores químicos y sus funciones .....	30
Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas de evaluación antiinflamatoria “ <i>in vitro</i> ”. 64	
Tabla 3. Aplicaciones del ensayo de estabilización de membrana eritrocitaria (HRBC). ....	72
Tabla 4. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la desnaturalización de proteínas. 89	
Tabla 5. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la COX.....	101
Tabla 6. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la lipoxigenasa .....	104
Tabla 7. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos .....	107
Tabla 8. Aplicaciones de otras técnicas “ <i>in vitro</i> ” para valorar actividad antiinflamatoria. .....	129



**ANEXOS.**

Anexo 1. COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit ítem No.700100..... 151

Anexo 2. Lipoxigenase Inhibitor Screening Assay Kit Itemen N. 760700..... 159

Anexo 3. COX (ovine) Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit Item No. 760111..... 171

Anexo 4. COX-2 (human) Inhibitor Screening Assay Kit Item No. 701080 ..... 179



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Jessica Leticia Cisneros Ortiz, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Técnicas de evaluación de la actividad antiinflamatoria "In vitro" y su aplicabilidad a plantas medicinales**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGANICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 05 de mayo del 2021

Jessica Leticia **Cisneros** Ortiz

CJ:0605428374



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jessica Leticia Cisneros Ortiz autor/a del trabajo de titulacion "Técnicas de evaluacdn de la actividad antiinflamatoria "in vitro" y su aplicabilidad a plantas medicinales". certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigation son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 05 de mayo del 2021

Jessica Leticia Cisneros Ortiz

C.I: 0605428374



## ABREVIATURAS

**5-HETE:** ácido 5-hidroxiieicosatetraenoico

**5-HPETE:** hidroperoxieicosatetraenoico

**AA:** ácido araquidónico

**Ags:** antígenos

**AH:** ácido hialurónico

**AINES:** antiinflamatorio no esteroide

**cAMP:** adenosin monofosfato cíclico

**CI50:** concentración a la que hubo 50% de inhibición

**cNOS:** óxido nítrico sintasa constitutiva

**COX:** ciclooxigenasa

**DMEM:** Medio modificado de Dulbecco

**DMF:** dimetilformamida

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DTNB:** Ácido 5,5'-ditiobis- 2-nitrobenzoico.

**ECP:** proteína catiónica de los eosinófilos

**EDN:** neurotoxina

**EGF:** factor de crecimiento de la epidermis.

**EPO:** peroxidasa de los eosinófilos

**ERO:** especies reactivas de oxígeno

**FBS:** suero bovino fetal

**fMLP:** N-formilmetionil-leucil-fenilalanina

**FPR:** receptor formil péptido

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia



**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1

**IFN- $\alpha$ :** interferón tipo 1 alfa

**IgM:** inmunoglobulina M

**IL:** interleucina

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**LFA-1:** antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos

**LO:** lipoxigenasa

**LPS:** lipopolisacárido

**LsB:** linfocitos B

**LTA<sub>4</sub>:** Leucotrieno A4

**LTB<sub>4</sub>:** leucotrieno B4

**MACs:** moléculas de adhesión celular

**MBP:** proteína básica mayor.

**MEC:** matriz extracelular

**MPO:** mieloperoxidasa

**NaCl:** cloruro de sodio

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

**NDGA:** ácido norhidroguayarético

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**NLRs:** receptores tipo NOD

**nNOS:** óxido nítrico sintasa neural

**NO:** óxido nítrico

**NOs:** óxido nítrico sintasa

**PAF:** factor activador de plaquetas

**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos



**PBS:** tampón de fosfato isotónico

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E2

**PGHs:** Prostaglandina H

sintasa **PLA<sub>2</sub>:** fosfolipasas A2

**PMN:** polimorfonucleares

**ROS:** especies reactivas del oxígeno.

**SAAVNA:** succinil-l-alanil-l-alanil-l-vanil-p-nitroanilida

**TLRs:** receptores tipo toll

**TMPD:** N<sup>1</sup>-tetrametil-p-fenilendiamina

**TNF:** factor de necrosis tumoral.

**TXA<sub>2</sub>:** tromboxano A2

**VCAM-1:** molécula 1 de adhesión a la célula vascular

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio

**XDH:** xantina deshidrogenasa

**XO:** xantina oxidasa



## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación es dedicado principalmente a mis padres Camilo Cisneros Rodas y Ana Ortiz Castillo, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a la confianza brindada de su parte he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mis hermanos Carlos, Byron, Karen, Anita y Camilo por estar siempre presentes brindándome su apoyo moral, emocional y económico.

A mi novio Jorge Sánchez, por ser mi compañero y mejor amigo, quien ha estado a mi lado durante este proceso para la obtención de mi título, gracias por tu amor y paciencia.



## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por bendecirme con salud y sabiduría, guiarme a lo largo de mi existencia, darme fortaleza en momentos de dificultad y permitirme obtener mi título.

Gracias a mis padres y hermanos, por ser los promotores principales de mi formación académica, por brindarme confianza, principios y valores, por aconsejarme, y creer en mí.

Agradezco a mis docentes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, por compartir sus conocimientos durante mi camino a ser profesional, de manera especial, a la Dra. Eugenia Peñaherrera W. Mgt., tutora de mi trabajo de titulación, gracias por la confianza y paciencia que ha tenido conmigo durante este proceso, sin su ayuda no hubiese sido posible alcanzar esta meta.



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades inflamatorias afectan a más del 80% de la población mundial. Son enfermedades crónicas que afectan la calidad de vida del paciente, incapacitándolo o incluso causando su muerte. Entre las patologías más importantes que cursan con procesos inflamatorios está la artritis reumatoide y el asma; patologías más comunes en adultos mayores y en niños respectivamente. La prevalencia de artritis reumatoide a nivel mundial oscila entre el 0,3-1,2%, y en la población latinoamericana es cercana al 0,5% (Noa Puig et al., 2011). Asimismo, la prevalencia de asma en Latinoamérica se estima que corresponde al 17 %, y en Ecuador al 10,1% (Ocampo et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) califica a las enfermedades inflamatorias crónicas como la causa más importante de muerte en el mundo y, en definitiva, constituyen un problema importante de salud pública. Estas enfermedades generalmente se caracterizan por presentar dolor, edema, y enrojecimiento, obligando al paciente a ir en busca de atención médica para aliviar dichos síntomas. Los medicamentos más prescritos para tratar estas afecciones son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que abarcan un gran número de fármacos que presentan propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, también se prescribe glucocorticoides para tratar procesos inflamatorios graves y generalizados (Gómez Ordóñez et al., 2007). Sin embargo, la mayoría de pacientes utilizan plantas medicinales y productos naturales para tratar sus procesos inflamatorios agudos, ya que están a su alcance y porque no generan reacciones adversas como lo hacen los AINEs. El uso prolongado de los AINEs causa efectos adversos graves en el paciente como la irritación de la mucosa gástrica que puede dar lugar a la formación de úlceras, hepatotoxicidad, nefropatía, y reacciones hematológicas entre otras.

Por estas razones en los últimos años ha despertado interés científico sobre el estudio de la actividad antiinflamatoria en plantas medicinales y productos naturales para el descubrimiento de nuevos fármacos que sean más efectivos y causen menos efectos adversos en los pacientes. Es importante mencionar que la aplicación de técnicas “*in vitro*” es uno de los primeros pasos para la investigación de moléculas que presenten actividad antiinflamatoria. Las investigaciones en Ecuador sobre la actividad antiinflamatoria en extractos vegetales se realizan aplicando técnicas “*in vitro*”, sin embargo, no hay una revisión



sistematizada que describa las ventajas, desventajas y limitaciones de todas las técnicas “*in vitro*”. En Cuba, en marzo del 2020, se realizó una revisión de las técnicas “*in vitro*” e “*in vivo*” para valorar la actividad antiinflamatoria de las plantas medicinales locales, sin embargo, solo describe las técnicas más utilizadas, dejando a un lado otros ensayos que también pueden ser empleados para examinar el potencial antiinflamatorio de los distintos compuestos. En definitiva, es necesario realizar una revisión sistematizada de las técnicas antiinflamatorias “*in vitro*”, en la cual se describa la planta medicinal utilizada, las ventajas y desventajas de la técnica, para disponer de una guía sólida de nuevos posibles compuestos antiinflamatorios de origen vegetal y estén al alcance de todo investigador para acortar el tiempo de investigación.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Analizar la literatura científica disponible de las técnicas “*in vitro*” que valoran la actividad antiinflamatoria y su aplicabilidad en productos naturales, a través de una revisión sistematizada.

### **Objetivos específicos:**

Disponer de una base de datos de las técnicas de actividad antiinflamatoria en las diferentes etapas del proceso con el fin de contribuir al trabajo inicial en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antiinflamatorio, analizar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas “*in vitro*” descritas en la literatura y valorar su aplicabilidad en plantas medicinales y productos naturales.

## CAPITULO I

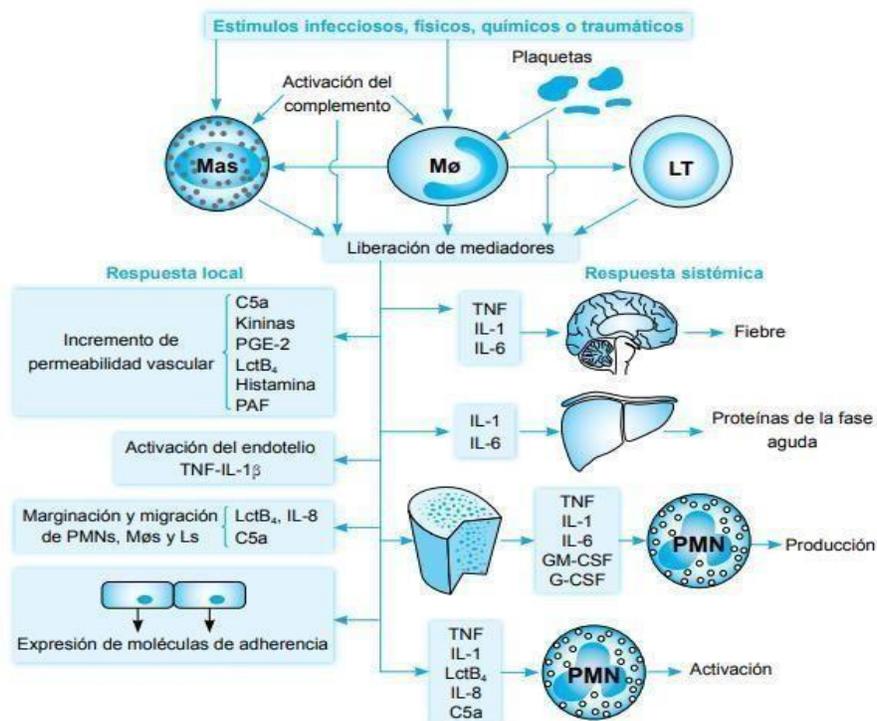
### 1. INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso fisiológico de defensa del sistema inmune, que se presenta como respuesta ante un daño causado a las células y tejidos, ya sea por una agresión física, química, infecciosa o autoinmune, con el fin de aislar la zona afectada, contener la lesión, destruir al agente agresor e iniciar la reparación del tejido. Interviene tanto la inmunidad innata como la adquirida (Cano et al., 2015; Rivera Guilcapi, 2018; Villalba Herrera, 2014).

#### 1.1. PROCESO INFLAMATORIO.

El proceso inflamatorio puede ser local y/o sistémico, en el primero participan células como los mastocitos, PMNs y el endotelio vascular y se caracteriza por presentar síntomas como edema, calor, rubor y dolor, en cambio, en el proceso inflamatorio sistémico participa el sistema de complemento, coagulación y kininas, y se generan metaloproteinasas, metabolitos del ácido araquidónico y citoquinas. La activación de todos estos mecanismos da lugar a la aparición de fiebre, leucocitosis y producción en el hígado de un grupo de proteínas denominada de la fase aguda (Imagen 1.) (Cano et al., 2015).

**Imagen 1. Componentes locales y sistémicos que participan en el proceso inflamatorio.**



**Fuente:** (Cano et al., 2015).



El proceso inflamatorio inicia cuando existe una agresión endógena o exógena al organismo. Como se mencionó anteriormente, cualquiera que sea el estímulo, se produce una respuesta inflamatoria aguda e involucra cambios vasculares y acontecimientos celulares. Entre los cambios vasculares se produce la modificación del calibre vascular para aumentar el flujo sanguíneo (vasodilatación), y alteraciones en la microvasculatura del endotelio, con el objetivo de incrementar la permeabilidad y permitir el paso de las proteínas plasmáticas hacia los tejidos. En cuanto a los acontecimientos celulares, se produce la migración de los leucocitos de la microcirculación hacia el foco de la lesión, con la consecuente acumulación de estos (Rodríguez, 2012).

A continuación, se describe la secuencia de los eventos importantes, así como los mecanismos estructurales y moleculares de la respuesta inflamatoria:

### **1.2.1. Cambios Vasculares.**

#### **1.1.1. Vasodilatación y liberación de mediadores de la inflamación.**

Después de una lesión independientemente de su naturaleza, hay un período transitorio (que dura unos segundos), en el cual se produce una vasoconstricción arteriolar y se da el reconocimiento de lo extraño mediante moléculas de reconocimiento, como son los Receptores tipo Toll (TLRs), lectinas, pentraxinas o Receptores intracelulares (NLRs), que, por medio de señales de alarma, permiten la llegada al sitio de la lesión determinadas cantidades de histamina y de óxido nítrico (NO), que en conjunto, producirán vasodilatación arteriolar. Producto de la vasodilatación arteriolar, la microvasculatura aumenta paulatinamente su permeabilidad, permitiendo la extravasación del líquido con abundantes proteínas a los tejidos extravasculares, como consecuencia se origina una mayor concentración de glóbulos rojos, que aumentan la viscosidad de la sangre en los vasos de menor calibre, generando un estado de *estasis* vascular. A medida que evoluciona la estasis, los leucocitos especialmente neutrófilos, empiezan a adherirse y acumularse en la superficie del endotelio vascular, proceso denominado *marginación*, este es el primer paso en el largo recorrido que deben realizar los leucocitos (descrito más adelante).

#### **1.1.2. Aumento de la permeabilidad vascular.**

Posterior a la vasodilatación arteriolar y al aumento del flujo sanguíneo se produce el aumento de la presión hidrostática intravascular, lo que provoca que el líquido pase de los capilares hacia los tejidos, este líquido se denomina *trasudado*, y es un ultrafiltrado del



plasma sanguíneo y se caracteriza porque su contenido proteico es escaso. Sin embargo, la trasudación se ve amortiguada por el aumento de la permeabilidad vascular que permite el paso de líquido rico en proteínas (exudado) e incluso de células al intersticio. La pérdida de proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular y aumenta la presión osmótica del líquido intersticial, lo que provoca salida de agua e iones a los tejidos extravasculares. El acúmulo de líquido en los espacios extravasculares se denomina *edema*.

En condiciones normales el endotelio hace intercambio de proteínas mediante pinocitosis, y no permite la salida de proteínas, por lo tanto, el intercambio de líquido y la permeabilidad vascular dependen exclusivamente de la integridad del endotelio (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

### **1.1.2. Células que participan en el proceso inflamatorio.**

#### **1.1.2.1. Mastocitos (Mas)**

**Origen y localización:** se originan en la médula ósea a partir de la célula progenitora mieloide, se ubican principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y canales linfáticos de la piel y de las mucosas, también se encuentran en órganos con abundante tejido conectivo como la glándula mamaria, lengua, próstata, pulmones y peritoneo. Tiene la capacidad de multiplicarse en los tejidos.

**Estructura:** presentan en su membrana moléculas de reconocimiento de lo extraño como: TLRs que interactúan con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lectinas que reconocen lipopolisacáridos, receptores Fc para reconocer anticuerpos (Acs) de las clases de IgM, IgG e IgE que se hayan unido a microorganismos. En su citoplasma presentan miles de gránulos que contiene heparina, histamina, y enzimas como histidina descarboxilasa, proteasas, fosfatidina A, fosfatasa acida y alcalina,  $\beta$ -glucoronidasa y factor activador de plaquetas (PAF).

**Función:** liberar histamina rápidamente para generar vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, simultáneamente libera heparina que regula el proceso inflamatorio, cuando este ha cumplido su función, bloqueando las selectinas L y P y estimulando en el hígado la producción de histaminasa.



### 1.1.2.2. Basófilos.

**Origen y localización:** se originan en la médula ósea a partir de una célula madre. Se encuentra en la sangre circulante, pero pueden migrar a los órganos linfoides y contribuir en el desarrollo de la respuesta de las citoquinas del grupo Th2.

**Estructura:** son leucocitos polimorfonucleares (PMN), en su citoplasma presentan numerosos gránulos que contienen proteoglicanos y cristales de Charcot-Leyden. Cuando se degranulan liberan una proteína llamada vasogranulina y algunas moléculas de adherencia como ICAM-1, y citoquinas como IL-3, IL-5.

**Función:** participan en la respuesta inmune contra infecciones bacterianas y parasitarias, también intervienen en la respuesta alérgica mediada por la Inmunoglobulina E y sintetizan factores de crecimiento.

### 1.1.2.3. Eosinófilos.

**Origen y localización:** se originan en la médula ósea, salen a la circulación por efecto de la IL-5, inmediatamente colonizan las mucosas para poder proteger al organismo ante la presencia de patógenos y en el caso de alergias, de los alérgenos.

**Estructura:** su citoplasma está lleno de gránulos, divididos en dos clases, los primarios son pequeños y almacenan hidrolasas ácidas como la aminopeptidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, arilsulfatasa y catpesina ácida, y los otros gránulos contienen la proteína básica mayor (MBP), neurotoxina (EDN), peroxidasa de los eosinófilos (EPO) y proteína catiónica de los eosinófilos (ECP).

**Función:** participan en la defensa contra parásitos, remodelación de tejidos, e interactúan con diversas células, y promueven una respuesta humoral específica para que los LsB produzcan anticuerpos IgM. Así también interactúan con el endotelio y ayuda a la conservación y reparación de mucosas. Y actúan como células presentadoras de Ags para inducir a una respuesta inmune específica.



#### 1.1.2.4. Plaquetas

**Origen y almacenamiento:** se origina en la médula ósea a partir de los megacariocitos, y se encuentran en la sangre circulante.

**Estructura:** presentan un citoesqueleto bien definido, y en su citoplasma contienen abundantes gránulos denominados  $\alpha$ .

**Funciones:** su función principal detectar cualquier daño a nivel de epitelio vascular, así como interactuar con el factor de Von Willerbrand para iniciar un proceso de coagulación local. Participan en el proceso inflamatorio después de ser activadas por el PAF, producido por macrófagos, eosinófilos, PMNs, mastocitos y células endoteliales. El PAF presenta actividad vasodilatadora, mil veces superior a la histamina.

#### 1.1.2.5. Fibroblastos

**Origen y localización:** están presentes en todos los tejidos en los que se sintetizan colágeno.

**Funciones:** intervienen en la fase de resolución de la inflamación y cicatrización de heridas, mediante la colaboración en la producción de la IL-6, que induce al hígado a producir proteínas de fase aguda (Cano et al., 2015).

### 1.1.3. Acontecimientos celulares

#### 1.1.3.1. Reclutamiento y activación de los leucocitos.

La respuesta inflamatoria tiene como objetivo aportar leucocitos al sitio de la lesión, éstos son los encargados de fagocitar a los agentes patógenos, de destruir a bacterias y microorganismos, de degradar el tejido necrótico y sustancias extrañas. Sin embargo, los leucocitos también pueden prolongar la lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales libres.

El recorrido secuencial que realizan los leucocitos desde la luz vascular hasta alcanzar el tejido intersticial (extravasación), es extenso y consta de los siguientes pasos:

1. Marginación, adhesión al endotelio y rodamiento a lo largo de la pared vascular.
2. Firme adhesión al endotelio.
3. Transmigración a través del endotelio (diapédesis).
4. Migración en los tejidos intersticiales hacia un estímulo quimiotáctico.



### **1.1.3.2. Marginación y rodamiento.**

El proceso de marginación ocurre cuando hay desplazamiento y acumulación leucocitaria en la periferia de los vasos, ya que disminuyen las fuerzas de cizallamiento debido al incremento de la permeabilidad vascular. En el proceso de *rodamiento o rodadura*, los leucocitos ruedan sobre la superficie endotelial y se adhieren transitoriamente gracias a moléculas denominadas *selectinas*, no obstante, esta adhesión es débil y transitoria. Existen diversos tipos de selectinas; la selectina-E denominada también CD62E, expresada en las células endoteliales; la selectina-P (CD62P), presente en el endotelio y en las plaquetas y la selectina-L (CD62L) expresada en la mayoría de los leucocitos.

Las selectinas normalmente no se hallan presentes en las células, o se expresan en bajas concentraciones; sin embargo, ciertos mediadores específicos estimulan su producción, por ejemplo, la selectina P se distribuye a lo largo de la superficie celular para facilitar la unión leucocitaria, después de su exposición a mediadores como la histamina o la trombina. Así mismo la expresión de la selectina E, es inducida después de la estimulación por mediadores inflamatorios como IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

### **1.1.3.3. Adhesión y transmigración.**

Otro grupo de moléculas que intervienen en la adhesión de los leucocitos al endotelio, son las integrinas que logran el revestimiento completo del endotelio. Las integrinas son glicoproteínas heterodinámicas de adhesión transmembrana, normalmente se expresan sobre la membrana plasmática de los leucocitos, y deben esperar a que los leucocitos sean activados por quimiocinas para posteriormente, adherirse a sus respectivos ligandos en las células endoteliales.

Después que las quimiocinas activen los leucocitos, las células endoteliales también se activan y sus integrinas modifican su estructura para convertirse en formas con gran afinidad. Las células endoteliales también son activadas por el TNF e IL-1 para aumentar su expresión de ligandos para integrinas. Los principales receptores de tipo integrinas son: ICAM-1 (molécula 1 de adhesión intercelular), que se une a las integrinas LFA-1 y la VCAM-1 (molécula 1 de adhesión a la célula vascular) que se une a integrina VLA-4. Finalmente, en el sitio de la lesión, se forma una fuerte unión entre los leucocitos y las células endoteliales.



Después de la unión estable, los leucocitos migran a través de la pared vascular, escurriéndose entre las células; a este proceso se le conoce como *diapédesis*; la migración de los leucocitos está influenciada por las quimiocinas de los tejidos extravasculares, que estimulan el movimiento de los leucocitos hacia su gradiente. Después de atravesar el endotelio, los leucocitos segregan colagenasas y degradan focalmente las membranas basales vasculares y salen al espacio extravascular (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

#### 1.1.3.4. Quimiotaxis.

Una vez que ocurre la extravasación de los leucocitos de la sangre, éstos alcanzan los sitios de infección o lesión a lo largo de un gradiente químico, mediante un proceso denominado *quimiotaxis*. Todos los leucocitos responden a estímulos quimiotácticos, bien sean endógenos o exógenos.

**Factores quimiotácticos exógenos:** generalmente son productos bacterianos, sobre todo péptidos con terminales N-formil-metionina.

**Factores quimiotácticos endógenos:** son componentes del sistema del complemento especialmente C5a, también productos de la vía metabólica de la lipoxigenasa del ácido araquidónico, principalmente el leucotrieno B4 y las citoquinas como la IL-8.

Las moléculas quimiotácticas se unen a receptores específicos de la superficie celular, como son los receptores acoplados a proteína G, gracias a esta unión, se producen señales de transducción las cuales llevan al aumento del calcio citosólico, que desencadena el ensamblaje de elementos citoesqueléticos contráctiles necesarios para el movimiento. Los leucocitos se mueven mediante pseudópodos que se anclan en la matriz extracelular (MEC). El tipo de leucocito que migra varía de acuerdo al tipo de la inflamación y del tipo de estímulo. Generalmente en las inflamaciones agudas predominan los neutrófilos en el infiltrado inflamatorio durante las primeras 6 a 24 horas y después de 24 a 48 horas son sustituidos por monocitos. Esta sustitución se debe a las características importantes de los cada uno de los leucocitos; si los neutrófilos llegan primero al sitio de la lesión, es porque son las células más numerosas en la sangre, por lo tanto, responden rápidamente a las quimiocinas. Además, los neutrófilos tienen una corta vida después de introducirse a los tejidos, mueren por apoptosis y desaparecen en 24 a 48 horas, mientras que los monocitos sobreviven más tiempo. Existen excepciones en ciertos procesos inflamatorios, por ejemplo, en el infiltrado celular de infecciones causadas por *Pseudomonas*, se observa neutrófilos



reclutados durante varios días; en infecciones víricas los linfocitos son las primeras células en llegar y en reacciones de hipersensibilidad son los eosinófilos el primer tipo de leucocito en reaccionar (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

También, depende del tipo de inflamación, así, en reacciones de hipersensibilidad, los mastocitos son los primeros leucocitos en secretar sus mediadores químicos. La activación del mastocito se origina por diversos mecanismos, el estímulo más frecuente es la agresión directa por el agente ofensivo. Otro mecanismo de activación se debe a su estructura, el cual presenta receptores para la porción Fc de la IgE; cuando dos IgE contiguas se unen específicamente al mastocito éste se activa y libera los mediadores preformados en sus gránulos especialmente la histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico de eosinófilos y neutrófilos (Bordés González et al., 2014; Villalba Herrera, 2014).

#### **1.1.3.5. Activación de los leucocitos.**

Una vez que los leucocitos llegan al sitio de lesión, deben activarse para ejercer sus funciones. Los leucocitos expresan en su superficie diferentes tipos de receptores que detectan la presencia de microbios. Los TRLs reconocen endotoxinas, productos bacterianos y víricos. La activación leucocitaria genera otros mecanismos como:

- Fagocitosis.
- Producción de sustancias tóxicas que destruyen microbios fagocitados.
- Eliminan los tejidos muertos.
- Producción de mediadores que amplifican la reacción inflamatoria, como los metabolitos del ácido araquidónico y citocinas.

#### **1.1.3.6. Fagocitosis.**

La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos constituyen efectos beneficiosos de la acumulación de los leucocitos en el sitio de inflamación. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas distintas pero interrelacionadas:

1. Reconocimiento y fijación del agente inflamatorio.
2. Interiorización, y formación de una vacuola fagocítica.
3. Destrucción o degradación del material fagocitado.

#### **1.1.3.7. Destrucción y degradación de los microbios.**

En esta etapa deben cumplirse dos procesos importantes, la producción de sustancias microbicidas dentro de los lisosomas y la fusión de los lisosomas con los fagosomas de modo



que puedan ser destruidos por los leucocitos. Las sustancias microbicidas importantes son las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las enzimas lisosómicas.

El proceso de fagocitosis estimula el consumo de oxígeno, proceso denominado *estallido oxidativo*. También aumenta el catabolismo del glucógeno (glucogenólisis), aumento de la oxidación de la glucosa y producción de los ROS.

La generación de ROS se realiza de la siguiente manera:

1. NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido), mediante la oxidasa leucocitaria denominada fagocito oxidasa, oxida el NADPH.
2. Convierte el oxígeno  $O_2$  a ion superóxido  $O_2^-$ , que es una sustancia bactericida, los radicales superóxido reaccionan con radicales hidroxilos, que contribuyen a la destrucción del microbio invasor.
3. Posteriormente, el superóxido es convertido a peróxido de hidrogeno; también se obtienen iones hidroxilo ( $OH^-$ ). Estas especies químicas pueden combinarse con el óxido nítrico NO para formar productos intermedios reactivos del nitrógeno.

Estas ROS actúan como radicales libres y destruyen los microbios, sin embargo, el peróxido de hidrogeno formado es insuficiente para destruir a las bacterias, por lo que necesitan la ayuda de los lisosomas de los neutrófilos. En los neutrófilos hay gránulos azurófilos que contienen la enzima mieloperoxidasa (MPO), cuando los gránulos se fusionen con un fagosoma, se libera la MPO al fagolisosoma y en presencia de un haluro como el cloro; el peróxido de hidrógeno se convierte en radical hipocloroso, que es un potente oxidante extremadamente tóxico para las bacterias, pues las destruye por halogenación o por peroxidación de las proteínas y lípidos. Por lo tanto, el sistema ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-haluro*** es el sistema bactericida de mayor eficacia en los neutrófilos.

La mieloperoxidasa contiene un pigmento hemo, el cual es el responsable del color verde de secreciones como el pus y el esputo que son ricos en neutrófilos.

Es importante mencionar, que los gránulos leucocitarios contienen otras sustancias capaces de destruir los microorganismos, estos comprenden:

- La proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad.
- La lisozima encargada de degradar los oligosacáridos del recubrimiento de membrana.



- La proteína básica mayor: constituyente de los gránulos eosinófilos que es citotóxica para los parásitos.
- Defensinas: péptidos que destruyen los microorganismos creando agujeros en sus membranas.

Después del estallido de oxígeno, el peróxido de hidrógeno es degradado a agua y oxígenos por acción de las catalasas. Y los microorganismos muertos son degradados por acción de enzimas hidrolasas lisosomales (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

Otra enzima productora de radicales libres es la enzima xantina oxidasa, que durante periodos hipóxicos pasa de su forma deshidrogenasa a su forma oxidasa, dando lugar a la formación del radical superóxido y peróxido de hidrógeno.

Durante estos procesos se puede valorar la actividad antiinflamatoria mediante dos ensayos, el primer ensayo que **inhiben las proteasas** presentes en los neutrófilos que a su vez evitarían el daño del tejido endotelial. Y un segundo ensayo es la **inhibición de la enzima xantina oxidasa**, impidiendo la formación de especies reactivas de oxígeno.

## 1.2. FORMACIÓN DE EICOSANOIDES

Los procesos bioquímicos que ocurren durante el proceso inflamatorio inician en la membrana con la activación de las enzimas: adenilato-ciclase y de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Cuando se activa la adenilato-ciclase se produce un aumento de la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico (AA). También aumenta la permeabilidad de membrana al Ca<sup>2+</sup>, con lo que incrementa la concentración de este ion. El aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y de cAMP determinan la formación de microtúbulos en el mastocito, así como el movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular, produciendo la fusión de los gránulos y la liberación de los mediadores al espacio extracelular.

El AA formado puede seguir dos vías metabólicas: 1) la de la enzima ciclooxigenasa que determina la formación de prostaglandinas y tromboxanos; y 2) la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos. Los productos derivados del AA afectan varios procesos biológicos, incluidas la inflamación y la hemostasia.

### 1.2.1. Vía de la ciclooxigenasa.

Los metabolitos de esta vía son: la prostaglandina E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>a2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), cada uno de ellos son producto de la acción de



enzimas específicas sobre un intermediario en la vía y cada una de ellas tiene una función y distribución específicos. Por ejemplo, el  $\text{TXA}_2$ , es un agente agregador de plaquetas y vasoconstrictor y se encuentra solo en las plaquetas ya que contienen la enzima tromboxano sintasa. En cambio, la  $\text{PGI}_2$ , denominada prostaciclina se encuentra en las células endoteliales, y cumplen la función de inhibir la agregación plaquetaria y la vasodilatación. La  $\text{PGD}_2$  es la principal prostaglandina de la vía de la ciclooxigenasa y junto con  $\text{PGE}_2$  y la  $\text{PGF}\alpha_2$  causan vasodilatación y potencian la formación de edema. Ambas, están implicadas en la patogenia del dolor y la fiebre.

### 1.2.2. Vía de la lipoxigenasa

Otra enzima que metaboliza el ácido araquidónico es la 5-lipoxigenasa. El primer producto de esta vía es el 5-hidroperoxi del AA, luego es convertido en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) que es muy inestable y rápidamente se reduce a ácido 5-hidroxeicosatetraenoico (5-HETE), que es una sustancia quimiotáctica para los neutrófilos o a su vez es convertido a compuestos denominados leucotrienos.

El primer leucotrieno generado es el leucotrieno  $\text{A}_4$  ( $\text{LTA}_4$ ), luego se genera el  $\text{LTB}_4$  o  $\text{LTC}_4$ , cada uno de ellos posee una función quimiotáctica diferente, el  $\text{LTB}_4$  es producido por los neutrófilos y ciertos macrófagos, además es un agente quimiotáctico para los neutrófilos. EL  $\text{LTC}_4$  y sus metabolitos son producidos en las células cebadas y contribuyen a la vasoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular.

Para controlar la producción de los metabolitos del AA, los leucocitos deben introducirse en los tejidos y sintetizar lipoxinas que inhiban la quimiotaxis de los neutrófilos y su adhesión al endotelio. Además, las plaquetas que se adhieren a los leucocitos también son fuentes productoras de lipoxinas (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

En todo este proceso bioquímico descrito, existe la participación de una serie de enzimas; como la **fosfolipasa A2**, **la enzima ciclooxigenasa** y **la enzima lipooxigenasa**; que cumplen roles importantes en la formación de prostaglandinas y leucotrienos, moléculas responsables de la inflamación. Hoy en día, se realizan ensayos “*in vitro*” para valorar actividad anti-inflamatoria utilizando el principio de inhibición de dichas enzimas (Bordés González et al., 2014; Villalba Herrera, 2014).



### 1.3. MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.

Los mediadores son un grupo de moléculas y células que favorecen el desarrollo de la respuesta inmune; se encuentran sustancias vasoactivas, citocinas, quimiocinas, metabolitos lipídicos, inmunoglobulinas, moléculas de adhesión celular (MACs), selectinas, integrinas, así como los sistemas de las kininas, coagulación, complemento y el fibrinolítico, cada mediador químico cumple una función diferente.

Existen dos tipos de mediadores: los preformados en los gránulos de las diferentes células del sistema inmune, y los mediadores de síntesis “*de novo*”.

#### 1.3.1. Mediadores preformados.

El mediador preformado más importante es la histamina, una amina vasoactiva que se encuentra almacenada en los mastocitos, basófilos y en las plaquetas. Y como se mencionó anteriormente produce vasodilatación arteriolar e incremento de la permeabilidad vascular, en la primera etapa de la inflamación además provoca contracción de células endoteliales, aumento de permeabilidad y quimiotaxis eosinofílica, y participa como mediador químico del dolor.

La heparina, se encarga de inhibir la coagulación para facilitar la llegada de moléculas y células; especialmente de eosinófilos y neutrófilos, que llegan al foco de la inflamación con la intervención de sus factores quimiotácticos.

La enzima proteolítica denominada kininogenasa, preformada en los mastocitos, actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre, los kininógenos, produciendo su ruptura a péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor.

#### 1.3.2. Mediadores de síntesis “*de novo*”

Son los eicosanoides que incluyen la PGE2 y los leucotrienos. La PGE2 produce vasodilatación y dolor; y en coordinación con el factor C5a y el leucotrieno B4 aumenta la permeabilidad vascular. Así también, el leucotrieno B4 es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos

Otro mediador de síntesis de “*de novo*” es el PAF que se encarga de activar las plaquetas para liberar mediadores e iniciar procesos de coagulación. Es un factor quimiotáctico y activador de neutrófilos. Además, produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular (Rivera Guilcapi, 2018).

A continuación, se presenta una tabla resumen de los mediadores químicos y sus funciones.

**Tabla 1. Mediadores químicos y sus funciones**

<b>Mediador</b>	<b>Origen</b>	<b>Función principal</b>
<b>Derivados de células.</b>		
Histamina/ Serotonina (Aminas vasoactivas).	Mastocitos, basófilos, plaquetas/plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación endotelial.
Bradicinina		Incremento de la permeabilidad vascular y dolor.
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico).	Mastocitos y leucocitos	Vasodilatación, dolor, fiebre y activa a otros mediadores.
Leucotrienos.	Mastocitos y leucocitos	Aumento de la permeabilidad vascular, Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitarias, broncoconstricción, vasoconstricción.
Factor activador de plaquetas.	Leucocitos y células endoteliales	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, adhesión leucocitaria, quimiotaxis, degranulación, estallido oxidativo, cebado de leucocitos.
Metabolitos del oxígeno (radicales libres).	Leucocitos	Incremento de la permeabilidad, destrucción de microbios, daño endotelial y tisular.
Óxido nítrico.	Endotelio y macrófagos.	Relajación del músculo liso vascular, destrucción de microbios, citotoxicidad e incremento de la permeabilidad.
Citocinas Interleucina-1 (IL-1)	Macrófagos, linfocitos, células endoteliales, mastocitos.	Activación endotelial local, expresión de moléculas de adhesión, respuesta de fase



Factor de necrosis tumoral (TNF)		aguda sistémica, en infecciones graves, shock séptico.
Quimiocinas.	Leucocitos, macrófagos activados	Quimiotaxis, activación leucocitaria.
<b>Derivados de las proteínas plasmáticas.</b>		
Complemento. C3a y C5a (Anafilotoxinas)	Plasma (producido en el hígado).	Quimiotaxis y activación leucocitarias, opsonización, vasodilatación, estimulación de mastocitos.
kininas.	Plasma (producido en el hígado).	Aumento de la permeabilidad vascular, concentración del musculo liso, vasodilatación y dolor
Proteasas activadas durante la coagulación.	Plasma (producido en el hígado).	Activación endotelial, reclutamiento de leucocitos.

**Fuente:** (Vinay Kumar et al., 2008; León et al., 2015).

## 1.4. RESOLUCIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO

Una vez desarrollada la respuesta inflamatoria, las consecuencias finales dependen de la naturaleza e intensidad de la lesión, el sitio y el tejido afectado. No obstante, las distintas células y sistemas que participaron son desactivadas por diferentes mecanismos, y las células que no son requeridas mueren por apoptosis. Mueren los PMNs, se desactivan los mastocitos y los macrófagos participan en la remoción de los restos celulares o microbianos y los activan a los fibroblastos para iniciar la reparación de los daños producidos por el agente agresor. Los eosinófilos generan fosfolipasa D, enzima que inactiva el factor activador de plaquetas y la histaminasa inactiva la histamina.

### 1.4.1. Cicatrización.

Los fibroblastos conjuntamente con células endoteliales y epiteliales son estimuladas por citoquinas como el factor de crecimiento de la epidermis (EGF), y el factor de crecimiento



del endotelio (VEGF), para iniciar la cicatrización mediante el deslizamiento de células epiteliales para reemplazar a las células dañadas y cubrir el espacio causado por heridas o trauma.

#### **1.4.2. Fibrosis.**

La fibrosis es un proceso que consiste en la abundante producción de tejido conectivo, que se desencadena en ciertos tipos de inflamación, como en quemaduras, trauma, infecciones, afecciones autoinmunes, o en la inflamación causada por materiales extraños, como implantes de silicona. Los fibroblastos son activados por la IL-1, llegan al sitio de la herida, y proliferan y sintetizan colágeno; también incrementan la proliferación de células epiteliales (Rivera Guilcapi, 2018).



## CAPITULO II.

### 2. PRUEBAS “*IN VITRO*” QUE EVALÚAN LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

#### 2.1. ENSAYO DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA.

La estabilización de las membranas es un mecanismo importante en la actividad antiinflamatoria. La membrana eritrocitaria es análoga a la membrana de los lisosomas que son estimulados en el proceso inflamatorio. Tomando en cuenta esta analogía se podría extrapolar la estabilización de la membrana eritrocitaria a la estabilización de la membrana lisosomal. Al evitar la ruptura de las membranas lisosomales se limita la salida de mediadores de la inflamación de los macrófagos y neutrófilos activados como la histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos etc., controlando de esta manera el desenlace del proceso inflamatorio. Por lo tanto, aquellas sustancias que inhiben la hemólisis también evitan y/o protegen a la membrana lisosomal (Salazar López et al., 2018).

La vitalidad de las células depende de la integridad de sus membranas, la exposición de los glóbulos rojos a una solución hipotónica da como resultado la lisis de su membrana acompañada de hemólisis y oxidación de la hemoglobina. Como consecuencia de la ruptura de la membrana la célula se vuelve más susceptible a procesos de peroxidación lipídica inducida por radicales libres. Se desconoce sobre el mecanismo exacto por el cual los extractos vegetales protegen la membrana resistiendo a la lisis osmótica, sin embargo, se cree que pudiera ser el aumento de la retención de los solutos intracelulares o la interacción con proteínas de membrana (Padmanabhan & Jangle, 2016; Valdés et al., 2018).

#### **Procedimiento.**

1. Recolectar 5ml de sangre entera de voluntarios humanos sanos y que no hayan consumido AINEs u otras drogas por lo menos dos semanas antes del experimento. Considerar que la extracción de la sangre debe realizarse en un tubo con anticoagulante como la heparina, caso contrario algunos autores recomiendan que la muestra de sangre debe mezclarse con un volumen igual de solución de Alsever esterilizada (2% de dextrosa, 0,8% de citrato de sodio, ácido cítrico 0,05% y 0,42% de cloruro de sodio en agua).



2. Luego se centrifuga la sangre a 3000 rpm por 10 minutos y el paquete globular se lava tres veces con solución isosalina (0,9% pH 7,2).
3. Posteriormente se mide el volumen de sangre y se completa con solución isosalina hasta formar una solución de hematíes al 10% V/V. También se puede preparar una solución de glóbulos rojos al 40% V/V utilizando tampón de fosfato isotónico (PBS) que se compone de 154 mM de NaCl en 10 mM de fosfato de sodio tampón a pH7,4 o el tampón isotónico también se puede preparar de la siguiente manera: en 1 litro de agua destilada mezclar 0,26g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  más 1,15g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y 9g de NaCl y ajustar el pH a 7,4 (Acostupa et al., 2017; Rashid et al., 2011).

La actividad de estabilización de la membrana del eritrocito puede ser evaluada mediante el uso de: una solución hipotónica y/o calor como agentes hemolíticos:

**A) Hemólisis inducida con solución salina hipotónica.**

1. En un tubo mezclar 0,5 ml de la solución a 10% V/V de glóbulos rojos, más 1 ml de buffer de fosfato pH 7.4 y 1 ml de solución salina hipotónica (0.3% P/V).
2. A dicha mezcla se agrega 1 ml de los extractos vegetales o animales obtenidos y preparados previamente en las siguientes concentraciones 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  utilizando solución isosalina como medio de dilución.
3. Para preparar el control negativo se emplea un tubo con la mezcla de reacción más 1 ml de solución salina isotónica en lugar de los extractos.
4. Para el control farmacológico se emplea la mezcla de reacción más 1 ml de indometacina preparada con solución salina isotónica a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
5. Incubar todos los tubos a 37°C por 30 minutos para inducir la lisis de los glóbulos rojos, posteriormente centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.
6. Medir las absorbancias de los sobrenadantes en el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 540 nm para calcular el contenido de hemoglobina, el cual fue usado como un indicativo del grado de hemólisis (a mayor hemoglobina mayor hemólisis).
7. Realizar los ensayos por triplicado y utilizar como blanco de lectura PBS.
8. Finalmente registrar los valores y aplicar la ecuación de la determinación del porcentaje de actividad antiinflamatoria Ec1 y Ec2. (Salazar López et al., 2018).

**B) Hemólisis inducida por calor.**



1. Para este método se emplea la misma mezcla de reacción descrita anteriormente, a la cual se le añade 1 ml de cada una de las diferentes concentraciones ensayadas de los extractos experimentales.
2. Como control negativo se emplea la mezcla de reacción con 1 ml de solución salina isotónica en lugar de los extractos.
3. Para el control positivo se utiliza la indometacina en concentración de 100 µg/ml con la mezcla de reacción.
4. Así mismo los ensayos se realizan por triplicado.
5. Incubar todos los tubos a 57 °C por un periodo de 30 min, o a 54°C en baño maría por 20 min.
6. Centrifugar las muestras a 2500 rpm durante 5 min y leer las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS a 560 nm (Salazar López et al., 2018).

### **Cálculos.**

En ambas pruebas se aplican las mismas ecuaciones. En primer lugar, se determina el porcentaje de hemólisis sobre los eritrocitos mediante la Ec.1 y luego se calcula el porcentaje de estabilización de la membrana de acuerdo a la Ec.2 detalladas a continuación:

$$\% \text{dehemólisis} = \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}} \right) * 100 \quad \text{Ec.1}$$

$$\% \text{deestabilidad} = 100 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control}} \right) * 100 \quad \text{Ec.2}$$

### **Conclusiones y observaciones.**

Este método evalúa la actividad antiinflamatoria *in vitro* tomando en cuenta a la membrana eritrocitaria como modelo biológico porque imita la membrana de los lisosomas, por lo tanto, los extractos vegetales con componentes bioactivos que tengan propiedades antiinflamatorias permitirán la estabilización de la membrana eritrocitaria frente al factor temperatura y a la lisis osmótica. Esta técnica se puede realizar en cualquier laboratorio de investigación, ya que no necesita de tecnología avanzada. Es posible realizar algunas modificaciones, por ejemplo, en la concentración de glóbulos rojos, algunos autores recomiendan al 10% V/V, y otros recomienda al 40% V/V. En cuanto a la inducción de hemólisis de glóbulos rojos se



realiza mediante dos procedimientos, por calor o utilizando una solución hipotónica; sin embargo, no es mandatorio realizar los dos procedimientos.

## **2.2. INHIBICIÓN DE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA.**

La desnaturalización de proteínas significa la pérdida de sus funciones biológicas y se debe a diversos factores; como el estrés, cambios bruscos de pH, contacto con disolventes orgánicos, calor, detergentes, fuerza iónica etc. Este fenómeno ocurre con frecuencia en el proceso inflamatorio de diversas enfermedades como la artritis reumatoide, la diabetes, el cáncer etc., por esta razón la determinación de la desnaturalización de las proteínas principalmente de la albúmina es una medida del potencial antiinflamatorio de los distintos compuestos presentes en extractos vegetales (Sánchez Chino et al., 2019).

Mediante este ensayo se determina que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de proteínas y el porcentaje de inhibición de la desnaturalización por lo tanto, la turbidez es directamente proporcional a la desnaturalización provocada por calor y cambio de pH, y la actividad antiinflamatoria se reporta mediante el % de inhibición de la desnaturalización de la proteína (Carrillo Terán & Cárdenas Hidalgo, 2016; Padmanabhan & Jangle, 2016).

### **Procedimiento.**

1. En un tubo colocar 0,2 ml de albúmina de huevo (de gallina fresco), más 2,8 ml solución salina tamponada con fosfato (pH 6,4) y 2 ml de la muestra a analizar (extractos vegetales, animales), se utiliza el agua destilada como control.
2. Todas las muestras son incubadas a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  en una incubadora durante 15 minutos.
3. Luego se induce la desnaturalización de las muestras someténdolas a calentamiento en baño maría a  $70^\circ \text{C}$  durante 5-10 minutos.
4. Después dejar enfriar, y medir la turbidez en un espectrofotómetro a 660nm.
5. De la misma manera se determina la absorbancia del control positivo que puede ser diclofenaco a una concentración de (1mg/ml) o ácido acetilsalicílico 100ug/ml
6. Los ensayos se realizan por triplicado y se obtiene un promedio de los valores obtenidos.

**Cálculos.**

$$\% \text{ de desnaturalización} = 100 - \left[ \frac{(\text{Absorbancia a } 280 \text{ nm}) - (\text{Absorbancia a } 205 \text{ nm})}{\text{Absorbancia a } 205 \text{ nm}} \times 100 \right]$$

**Ec.3****Conclusiones y observaciones.**

Esta técnica es fácil de realizar en cualquier laboratorio de investigación, por la disponibilidad de los reactivos. Evalúa la desnaturalización de proteínas por tratamiento térmico. La albúmina es la principal proteína que se analiza y debe ser sometida a temperaturas mayores a 37°C para que se produzca la pérdida de su estructura y por ende la pérdida de su función, por tal motivo ciertos investigadores realizan la desnaturalización a 51°C y otros a 57°C, o hasta 70°C, por 10min y hasta 30 minutos. Por lo tanto, aquellos extractos vegetales que presenten compuestos bioactivos que protejan a las proteínas de la variación de temperatura son considerados antiinflamatorios, ya que la desnaturalización de proteínas es una causa bien documentada de inflamación.

**2.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LIPOOXIGENASA.**

Las lipooxigenasas son un grupo de enzimas citosólicas ampliamente distribuidas en las plantas, animales y hongos. Contienen una molécula de hierro no hemo en su estructura y catalizan la dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados dando como producto hidroperóxidos de ácidos grasos. Esta enzima presenta una sola cadena polipeptídica con un dominio terminal del tipo barril-β y un dominio catalítico formado por hélices, donde se encuentra la molécula de hierro, cuando esta enzima se activa, el hierro no-hémico pasa de su estado de oxidación Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>.

Inicialmente su actividad fue descrita en plantas de soja (*Glycine max*), encontrándose 8 lipoxigenasas diferentes, sin embargo, en los seres humanos existen tres lipoxigenasas y son nombradas de acuerdo a la posición específica en que oxidan al ácido araquidónico, encontrándose así, la 5-lipoxigenasa (5-LO), 12-lipoxigenasa (12-LO), y la 15-lipoxigenasa (15-LO) formando los correspondientes hidroperóxidos lipídicos.

Existen diferentes isoformas de lipoxigenasas según el tipo celular en el que fueron caracterizadas inicialmente así tenemos:

**5-LO:** requiere una proteína específica activadora (FLAP).



**12-LO:** presenta tres isoformas; plaquetaria, leucocitarias y epidérmica.



**15-LO:** dos isoformas: reticulocitaria (15-LO1) y epidérmica (15-LO2).

La lipoxigenasa puede actuar sobre dos sustratos dependiendo de su origen, sobre el ácido linoleico si las LOX son de origen vegetal, y sobre el ácido araquidónico si las LOX son de origen animal.

Las lipoxigenasas juegan un rol importante en la respuesta inflamatoria, ya que sus productos dan lugar a la formación de leucotrienos y lipoxinas, se ha observado que las lipoxigenasas participan en diversas enfermedades como el asma, aterosclerosis, alzhéimer, artritis y algunos tipos de cáncer. Por tal motivo, la búsqueda de inhibidores específicos para estas enzimas se ha convertido en un reto para los investigadores. Diversos estudios demuestran que los polifenoles, alcaloides y terpenos son inhibidores de las lipoxigenasas, sin embargo, no es fácil encontrar un inhibidor específico ya que las isoformas de estas enzimas no solo son específicas en la posición que oxigenan, sino también entre las especies, tejidos y células en las que se encuentran (Titos Rodríguez, 2004; Toledo Valdés, 2015).

Para determinar la actividad inhibitoria de la lipoxigenasa se pueden utilizar kits comerciales, el kit de Cayman Chemical Item No. 760700 detecta y cuantifica los hidroperóxidos producidos en la reacción de lipoxigenación. La reacción es sensible y capaz de detectar a todos los hidroperóxidos resultantes presentes en el ácido graso y la reacción es útil en todos los ácidos grasos, sin importar el número de carbonos. Por ende, es un método de detección general para LOX, y puede usarse para identificar aquellos compuestos que inhiben dichas enzimas

El kit comercial contiene reactivos para reconstruirlos y utilizarlos; incluye una solución buffer, reactivo 1, reactivo 2, la enzima (15-lipoxigenasa), dos sustratos (ácido araquidónico y ácido linoleico), un control positivo (ácido nordihidroguayaráctico) y una placa sólida de 96 pocillos.

### **Procedimiento.**

#### **1. Preparación de los reactivos.**

**1.1. Solución buffer (tampón 1X):** diluir 3 ml de buffer concentrado con 27 ml de agua de calidad HPLC. Este tampón de ensayo se utiliza para diluir las muestras y la enzima 15-LO antes del ensayo.

**1.2. Reactivo 1 y reactivo 2:** listos para utilizar.



- 13. Cromógeno:** mezclar en un tubo volúmenes iguales del reactivo 1 y reactivo 2 y agitar en vórtex. El volumen de cromógeno a preparar depende del número de pocillos a utilizar tomando en cuenta que se necesita 100  $\mu\text{l}$  de cromógeno para cada pocillo. La estabilidad de la mezcla es de 60 minutos después de preparada.
- 14. Enzima:** 10  $\mu\text{l}$  de la enzima se diluyen con 990  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo en un vial, antes de usar se guarda en hielo y es estable por 1 hora.
- 15. Sustrato 1. Acido araquidónico:** vial que contiene una solución de ácido araquidónico en etanol y debe conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  cuando no esté en uso. En otro vial mezclar 25  $\mu\text{l}$  del sustrato y agregar 25  $\mu\text{l}$  de hidróxido de potasio, agitar en el vórtex y diluir con 950  $\mu\text{l}$  de agua de calidad HPLC para lograr una concentración de 1 mM. Esta preparación es estable dentro de 30 minutos. Una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  producirá una concentración de reacción de 91  $\mu\text{M}$  en los pocillos.
- 16. Sustrato 2. Ácido linoleico:** el vial contiene ácido linoleico en etanol, y se debe seguir el mismo procedimiento de preparación que para el ácido araquidónico

NOTA: Puede utilizar ácido araquidónico o linoleico en el ensayo. No es necesario utilizar ambos.

- 17. Hidróxido de potasio:** reactivo listo para utilizarse.
- 18. Ácido nordihidroguaiarético (NDGA):** vial que contiene 550 nmol de ácido nordihidroguaiarético que es el inhibidor no selectivo de la lipoxigenasa. Resuspender el vial en 500  $\mu\text{l}$  de buffer (tampón 1X) para obtener una solución madre de 1,1 mM. La adición de 10  $\mu\text{l}$  al ensayo produce una concentración final de inhibidor de 100  $\mu\text{M}$  en el pocillo.

**Nota:** Existen otros disolventes para los inhibidores, se pueden disolver en metanol o dimetilsulfóxido (DMSO), sin embargo, se observó una actividad enzimática ligeramente disminuida con DMSO. La dimetilformamida (DMF) y el etanol reducen drásticamente la actividad enzimática y, por lo tanto, no se recomiendan para disolver inhibidor.

## 2. Reacción

Las reacciones se llevan a cabo en una placa de titulación de 96 pozos provista por el kit. No existe un patrón específico para usar los pocillos en la placa. Sin embargo, se sugiere pipetear de la siguiente manera:



21. En los primeros dos pocillos pipetear 100 µl de buffer (tampón 1X) que son considerados como blanco.
22. En los pocillos siguientes colocar el control positivo (estándar 15-LO), el cual consta de 10 µl de 15-LO y 990 µl de tampón de ensayo.
23. En el siguiente pocillo pipetear el control positivo de la inhibición que consta de 100 µL de NDGA, a la concentración de 100 µM/pozo.
24. En los siguientes pocillos pipetear las muestras que incluyen 10 µL de la solución de la enzima 15-LOX, 980 µL del tampón de reacción y 10 µL de los extractos vegetales o animales.
25. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
26. Inicia la reacción cuando se agrega 10 µl de sustrato (ya sea ácido araquidónico o linoleico) a los pocillos de las muestras y al control positivo.
27. Cubrir la placa y colocar en un agitador a 30rpm a 37°C durante 5 minutos.
28. Posteriormente la catálisis enzimática se detiene agregando 100 µl de cromógeno a cada pocillo.
29. Cubrir la placa y colocar en un agitador de placas durante cinco minutos.
210. Los hidroperóxidos producidos en la reacción se miden en un lector de placas a 490-500 nm.
211. Se registran los datos y se aplica la Ec.4 para obtener el % de inhibición (Cayman Chemical, 2017).

**Cálculos.**

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{\text{Absorbancia Control} - \text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia Control}} \right) * 100 \quad \text{Ec.4}$$

**Conclusiones y observaciones.**

Existen kits de diversas casas comerciales para determinar la inhibición de los distintos tipos de lipoxigenasa. Este kit determina la inhibición de la 15-LOX de soya. Es una técnica enzimática, exacta y directa. Exacta porque los parámetros ya están estandarizados y hay que seguir las instrucciones del fabricante, y directa porque inhibe a la enzima generadora de mediadores de la inflamación.



## 2.4. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA.

La ciclooxigenasa o Prostaglandina H sintasa (PGHS) es una enzima que cumple dos funciones: como actividad COX y como peroxidasa. La actividad de ciclooxigenasa como se mencionó anteriormente, está relacionada con el metabolismo del ácido araquidónico (AA) para convertirlo en hidroperoxi endoperóxido (PGG<sub>2</sub>); mientras que la función peroxidasa reduce el endoperóxido al correspondiente alcohol (PGH<sub>2</sub>), el cual es el precursor de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina.

Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, denominadas COX-1 y COX-2, que son codificadas por diferentes genes y presentan estructuras químicas similares. La isoforma COX-1 es una enzima constitutiva de la mayoría de los tejidos y se encarga de la protección de la mucosa gástrica, controlar el flujo sanguíneo renal, participa en respuestas autoinmunes. También interviene en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular porque forma parte constitutiva de las plaquetas y posteriormente ocasiona la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> provocando la agregación plaquetaria y vasoconstricción.

Por otro lado, la COX-2 habitualmente no se detecta en los tejidos y aparece de forma inducida durante el proceso inflamatorio por varios estímulos como citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento. También se expresa en las células vasculares endoteliales normales, que secretan prostaciclina en respuesta al estrés de cizallamiento. Esta enzima es inhibida por todos los AINEs y también por los corticoides, los AINE COX-2 selectivos logran cumplir su actividad antiinflamatoria sin efectos secundarios, especialmente gástricos (Batlouni, 2010; Santos et al., 2012)

Mediante kits comerciales se logra determinar los inhibidores de las diferentes isoformas de la COX. Se pueden identificar inhibidores de la COX en general o inhibidores selectivos de la COX-2 y se puede realizar mediante métodos colorimétricos y fluorescentes.

A continuación, se describe el procedimiento para determinar inhibidores en general de la COX mediante un kit comercial, y los demás procedimientos se adjuntan en anexos.

### **Kit de ensayo de detección colorimétrica de inhibidores de COX (ovino) Item No. 760111**

El ensayo mide el componente peroxidasa de las COX. Se basa en la reacción de oxidación de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) durante la reducción de la prostaglandina G<sub>2</sub> a prostaglandina H<sub>2</sub> y el cambio de color es medido en un



espectrofotómetro. En el kit incluye enzimas COX-1 y COX-2 ovina para detectar inhibidores específicos de estas isoenzimas.

### **Procedimiento.**

#### **1. Preparación de los reactivos**

**1.1. Tampón de ensayo (10X):** Diluya 3 ml de tampón de ensayo concentrado con 27 ml de agua de calidad HPLC. Esta mezcla debe utilizarse para diluir las enzimas Hemina y COX antes del ensayo.

**1.2. Hemin:** cada vial contiene 300  $\mu$ l de Hemin en DMSO. Diluya 88  $\mu$ l de Hemin con 1,9 ml de tampón de ensayo anteriormente diluido. Es estable durante 12 horas a temperatura ambiente.

**1.3. COX-1 (ovino):** El vial contiene COX-1 ovina que debe mantenerse en hielo cuando se descongela. Diluir 120  $\mu$ l de enzima con 360  $\mu$ l de tampón de ensayo diluido y almacenar en hielo. Esta cantidad de enzima es suficiente para analizar aproximadamente 48 pocillos. Determine la cantidad de enzima de acuerdo al número de pocillos a utilizar; hay suficiente enzima para analizar 96 pocillos.

**1.4. COX-2 (recombinante ovino):** Este vial contiene COX-2 ovina recombinante y debe mantenerse en hielo cuando se descongela. Diluir 120  $\mu$ l de enzima con 360  $\mu$ l de tampón de ensayo diluido y almacenar en hielo. De igual manera determinar la cantidad de enzima necesaria para el número de muestras a analizar.

**1.5. Ácido araquidónico (sustrato):** Este vial contiene una solución de ácido araquidónico en etanol. Transferir 100  $\mu$ l del sustrato suministrado a otro vial, agregar 100  $\mu$ l de hidróxido de potasio, agite en el vórtex, luego diluir con 1,8 ml de agua de calidad HPLC para lograr una concentración final de 1,1 mM. Use la solución de ácido araquidónico preparada dentro de los 30 minutos.

**1.6. Hidróxido de potasio y Sustrato colorimétrico (TMPD):** Reactivos listos para utilizarse.

#### **2. Reacción**

**2.1. Pozos de fondo:** a los tres primeros pocillos agregar 160  $\mu$ l de tampón de ensayo y 10  $\mu$ l de hemina.

**2.2. Pozos de actividad inicial del 100%:** en los siguientes tres pocillos pipetear 150  $\mu$ l de tampón de ensayo, 10  $\mu$ l de hemina y 10  $\mu$ l de enzima (ya sea COX-1 o COX-2).



- 2.3. **Pozos inhibidores:** agregar 150  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo, 10  $\mu\text{l}$  de hemina y 10  $\mu\text{l}$  de enzima (ya sea COX-1 o COX-2). Además, añadir 10  $\mu\text{l}$  de inhibidor y 10  $\mu\text{l}$  de disolvente.
- 2.4. En los siguientes pocillos pipetear las muestras que incluyen 10  $\mu\text{L}$  de la solución de la enzima COX-1 o COX-2, más 160  $\mu\text{L}$  del tampón de reacción y 10  $\mu\text{L}$  de los extractos vegetales o animales.
- 2.5. Agite con cuidado la placa durante unos segundos e incube durante 5 min a 25 °C.
- 2.6. Agregue 20  $\mu\text{l}$  de la solución de sustrato colorimétrico a todos los pocillos que esté utilizando.
- 2.7. Agregue rápidamente 20  $\mu\text{l}$  de ácido araquidónico a todos los pocillos que esté utilizando.
- 2.8. Agite con cuidado la placa durante unos segundos e incube durante exactamente 2 min a 25°C.
- 2.9. Lea la absorbancia a 590 nm.
- 2.10. Todas las reacciones se realizan por triplicado

**Nota:** Los inhibidores pueden disolverse en metanol, dimetilsulfóxido o etanol y deben agregarse al ensayo en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ .

#### **Cálculos.**

1. Determine la absorbancia promedio de todas las muestras.
2. Reste la absorbancia de los pocillos de fondo de las absorbancias de la actividad inicial del 100% y los pocillos del inhibidor.
3. Reste cada muestra de inhibidor de la muestra de actividad inicial al 100%, luego divida por la muestra de actividad inicial al 100% y multiplique por 100 para obtener el porcentaje de inhibición.
4. Grafique el porcentaje de inhibición o el porcentaje de actividad inicial por la concentración de inhibidor para determinar el valor de CI50 (concentración a la que hubo 50% de inhibición) (Cayman Chemical, 2017).

#### **Conclusiones y observaciones.**

Existen diferentes kits comerciales determinar la inhibición de los distintos tipos de ciclooxigenasa (ovina o humana), y para las diferentes isoformas (COX-1 y/o COX-2). Con este kit se determina la inhibición de la COX (ovina), aplicando un método colorimétrico.



Hay que seguir cuidadosamente las instrucciones del fabricante, sobre todo en el control de los tiempos, tanto de incubación como de agitación, ya que la mayoría de los inhibidores presenta una inhibición de la actividad COX dependiente del tiempo. La alteración de los tiempos de incubación con el inhibidor puede cambiar significativamente el valor de CI50 aparente del compuesto.

## **2.5. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS PRO- INFLAMATORIAS.**

### **Inhibición de la fosfolipasa A2.**

Las fosfolipasas A2 (PLA2) constituyen una familia de enzimas que juegan un rol importante en una variedad de procesos celulares, incluyendo la digestión y metabolismo de los fosfolípidos, así como la producción de sustancias precursoras del proceso inflamatorio (García & García, 2009).

Estas enzimas hidrolizan el enlace éster sn-2 presentes en los glicerofosfolípidos de las membranas, liberando ácidos grasos, como el ácido araquidónico (AA). El AA liberado de la membrana, se oxida por las enzimas COX y LOX para producir eicosanoides. Este es un paso limitante de la biosíntesis de mediadores de inflamación, por lo tanto, inhibir la fosfolipasa A2, constituiría un proceso antiinflamatorio (Torres Carro et al., 2017).

La actividad inhibitoria de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, también se determina mediante kits comerciales, que se describe a continuación:

### **Kit de ensayo de detección de inhibidores de sPLA2 (tipo V) Item No. 10004883 de Cayman Chemical.**

El ensayo utiliza el análogo 1,2-di tio diheptanoil fosfatidilcolina como sustrato. Tras la hidrólisis del enlace tioéster en la posición sn-2 por sPLA2, los tioles libres se detectan utilizando DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico)).

### **Procedimiento.**

#### **1. Preparación de reactivos**

**1.1. Tampón de ensayo (10X):** Diluya 3 ml de tampón de ensayo concentrado con 27 ml de agua de calidad HPLC, debe utilizarse para la reconstitución del sustrato y la dilución de inhibidores solubles en agua.

**1.2. DTNB:** Reconstituya el contenido de un vial con 1,0 ml de agua de grado HPLC para producir DTNB 10 mM. Almacene el reactivo reconstituido en hielo en la oscuridad y utilícelo dentro de las ocho horas.



**1.3. Diheptanol Thio-PC (sustrato):** Evaporar la solución etanólica de diheptanoil tio-PC a sequedad bajo una suave corriente de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno, argón). Reconstituya el contenido de cada vial con 12 ml de tampón de ensayo diluido para lograr una concentración de 1,66 mM. Asegúrese de agitar hasta que la solución de sustrato se vuelva transparente.

**1.4. sPLA2 humana (tipo V):** El vial contiene una solución de sPLA2 recombinante humana (Tipo V). La enzima descongelada debe almacenarse en hielo. Diluya 20 µl de enzima con 980 µl de tampón de ensayo diluido. La enzima diluida es estable durante cuatro horas en hielo.

**1.5. Inhibidor de control positivo sPLA2:** El vial contiene una solución 2,3 mM de tioeteramida-PC disuelta en etanol.

## 2. Reacción

**2.1. Pozos de actividad inicial del 100%:** agregue 10 µl de sPLA2 y 10 µl de disolvente (el mismo disolvente que se utilizó para disolver el inhibidor) en tres pocillos. Los pocillos de 100% de actividad inicial deben exhibir una absorbancia de ~ 0,8-0,9.

**2.2. Pozo del inhibidor de control positivo:** agregue 10 µl de sPLA2 y 10 µl de tioeteramida-PC a tres pocillos. La concentración final de tioeteramida-PC en los pocillos de control positivo es 100 µM.

**2.3. Pozos de inhibidor:** agregue 10 µl de sPLA2 y 10 µl de inhibidor a tres pocillos.

**2.4. Pozos de fondo:** agregue 10 µl de tampón de ensayo y 10 µl de disolvente en tres pocillos.

**2.5.** En los siguientes pocillos pipetear las muestras que incluyen 10 µl de sPLA2, más 10µL del tampón de reacción y 10 µL de los extractos vegetales o animales.

**2.6.** Agregue 200 µl de solución de sustrato a todos los pocillos que se estén utilizando.

**2.7.** Agregue 10 µl de DTNB a todos los pocillos para iniciar la reacción.

**2.8.** Agite con cuidado el plato durante 10 segundos para mezclar y luego cúbralo con la tapa del plato. Incubar durante 15 minutos a 25 ° C.

**2.9.** Leer a una absorbancia entre 405-420 nm usando un lector de placas.

## Cálculos.

1. Determine la absorbancia promedio de cada muestra.



2. Reste la absorbancia de los pocillos de fondo de la absorbancia del 100% de actividad inicial y los pocillos inhibidores.
3. Determine el porcentaje de inhibición para cada muestra. Para hacer esto, reste cada valor de muestra de inhibidor del valor de muestra de actividad inicial del 100%. Divida el resultado por el 100% del valor de actividad inicial y luego multiplíquelo por 100 para obtener el porcentaje de inhibición.
4. Grafique el porcentaje de inhibición o el porcentaje de actividad inicial en función de la concentración de inhibidor para determinar el valor de CI50 (concentración a la que hubo 50% de inhibición) (Cayman Chemical, 2017).

### **Conclusiones y observaciones.**

Este kit comercial determina la inhibición de la fosfolipasa A2 (tipo V). Esta enzima es clave para el desenlace del proceso inflamatorio. Esta técnica también es exacta ya que todos los parámetros de control están estandarizados por el fabricante.

## **2.6. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA**

La hialuronidasa es una enzima cuya función es hidrolizar el ácido hialurónico (AH) rompiendo la unión glucosaminídica entre el carbono 1 de la fracción glucosamina y el carbono 4. EL ácido hialurónico es un glicosaminoglicano constituido por ácido glucorónico y N-acetil-glucosamina, se encuentra en la matriz extracelular de todos los tejidos, especialmente en el tejido conectivo como la piel. Al presentar una estructura de glucosaminoglicano, provee gran hidratación a la matriz extracelular, porque posee gran número de grupos OH y cargas negativas que lo hacen altamente hidrosoluble, y tener un comportamiento como gel, permitiendo que los tejidos resistan fuertes presiones mecánicas. El AH se adhiere a los receptores de superficie, como el CD44 que regulan la proliferación y migración celular. El objetivo de este receptor es conservar la estructura orgánica y tisular mediante la adhesión célula - célula y célula – matriz. Isoformas del receptor CD44 están involucradas en la unión inicial de los leucocitos a las células endoteliales activadas en procesos inflamatorios. El AH cumple distintas funciones en la génesis, mantenimiento y resolución de la inflamación subyacente, ya que en los procesos inflamatorios se produce una despolarización que altera la arquitectura del tejido, y como consecuencia dificulta el intercambio metabólico (Corte Sánchez et al., 2017).



Otras funciones importantes del AH es la migración de fibroblastos y la fibrogénesis, la regulación del nivel de proliferación y grosor de la epidermis, así como la proliferación de queratinocitos. El AH también está relacionado con el sistema locomotor, ya que las articulaciones están cubiertas por una membrana sinovial que es responsable de la homeostasis y la lubricación de la articulación mediante la síntesis de ácido hialurónico, que protege el cartílago articular y responde ante agresiones agudas (Fernández, 2019).

Varios investigadores han analizado que cuando una articulación cursa por un proceso inflamatorio (artritis), hay un descenso tanto del peso molecular como de la concentración del ácido hialurónico; en base a este análisis actualmente se considera que la inyección intraarticular de ácido hialurónico, es una terapia alternativa para la artritis, especialmente para la rodilla. Estudios experimentales en España han demostrado que una aplicación intrarticular de AH al 2% y manitol al 0,5% durante un periodo de seis meses, disminuye significativamente el dolor articular, rigidez e incapacidad funcional (Borrás-Verdera et al., 2012).

Existen dos métodos utilizados para valorar la actividad de la hialuronidasa, el método turbidimétrico y el método espectrofotométrico.

- **Método espectrofotométrico.**

La inhibición de la hialuronidasa se determina por espectrofotometría de absorción, midiendo la cantidad de N-acetilglucosamina producida por hialuronato de potasio.

- 1. Procedimiento.**

Para El hialuronato de potasio (0.6 mg) y concentraciones respectivas de las fracciones fueron adicionadas a la hialuronidasa activada, y se incubaron a 37° C por 20 min. El control se preparó agregando buffer acetato en lugar de la fracción. Se empleó 0.1 ml de NaOH 0.4 N y 0.1 ml de borato de potasio 0.4 M para detener la reacción de la enzima, seguido de calentamiento en baño de agua hirviendo por 3 min. Se agregó 3 ml de pdimetilaminobenzaldehido 67 mM a la mezcla anterior, y se incubó a 37 °C por 20 min. El control y las muestras tratadas con las fracciones se midieron a una densidad óptica (OD) de 585 nm. y se compararon con el ácido acetil salicílico (aspirina). La DO585 del control fue  $0.053 \pm 0.013$ . El efecto inhibitorio de las fracciones sobre la actividad de la hialuronidasa se calculó como sigue: % de inhibición =  $[( DO585 \text{ control} - DO585 \text{ muestra} ) / OD585 \text{ control} ] \times 100$ . Los resultados fueron el promedio de cinco determinaciones mas o menos la desviación estándar y se analizaron por el test de Student.



- 1.1. **Activar la hialuronidasa:** La enzima hialuronidasa (0.4 unidades) se activada por incubación añadiéndole CaCl<sub>2</sub> 2.5 mL en buffer de acetato 0.1M a pH 3.5 a 37° C por 20 min.
- 1.2. Adicionar a la enzima activada, 0.6mg de hialuronato de potasio y las diferentes concentraciones de los extractos, luego incubar a 37° C por 20 min.
- 1.3. El control se prepara agregando buffer acetato en lugar del extracto.
- 1.4. Para detener la reacción de la enzima, adicionar 0.1 ml de NaOH 0.4 N y 0.1 ml de borato de potasio 0.4 M, seguido de calentamiento en baño de agua hirviendo por 3 min.
- 1.5. Luego agregar 3 ml de p-dimetil-amino-benzaldehido 67 mM a la mezcla anterior, e incubar a 37 °C por 20 min.
- 1.6. Medir la densidad óptica (OD) a 585 nm del control y las muestras tratadas con los extractos y comparar con el ácido acetil salicílico (aspirina).

**Cálculos.**

$$\% \text{ hialuronidasa} = \frac{\text{OD muestra} - \text{OD control}}{\text{OD estándar}} \cdot 100 \quad \text{Ec.5}$$

Promediar los resultados de cinco determinaciones más o menos la desviación estándar (Pernía et al., 2004).

**Conclusiones y observaciones.**

Esta técnica permite valorar la actividad antiinflamatoria de compuestos bioactivos presentes en extractos vegetales o animales, mediante espectrofotometría de absorción, esta técnica requiere muchos tiempos de incubación, por lo tanto, es tardada. Diversos estudios sugieren que los flavonoides actúan de manera selectiva sobre las proteínas produciendo posiblemente su hidrólisis o su aglutinamiento de cualquier forma se traduciría en la inactivación de la misma. Existen otras técnicas, mediante turbidimetría, o precipitación de la hialuronidasa. El investigador tiene la última palabra para elegir la técnica que se ajuste a su presupuesto y disponibilidad de reactivos.

**Método turbidimétrico.**

Existe otra técnica aplicada actualmente para determinar la actividad antiinflamatoria, mediante el cambio de turbidez.

**Procedimiento.**

**Reconstituir los reactivos**



- A. **Solución buffer fosfato de sodio 300nM:** para ello diluir el fosfato de sodio monobásico anhidro en 100ml de agua desionizada, y ajustar el pH a 5,35 a 37°C con NaOH 1M
- B. **Solución de ácido hialurónico al 0,30% P/V:** calentar 5-10ml de agua justo hasta antes de hervir y disolver 3 mg/ml de ácido hialurónico durante aproximadamente 20 minutos para que se disuelva completamente
- C. **Solución de ácido hialurónico a 0,03% P/V (SUSTRATO):** preparar 10ml en el reactivo A, utilizando el reactivo B, precalentar a 37°C inmediatamente antes de usar.
- D. **Enzima diluida:** preparar en 150ml de agua desionizada una solución mezclando fosfato de sodio 20mM, con cloruro de sodio 77mM y con 0,01% de albuminasérica bovina, ajustar el pH a 7 usando NaOH 1M.
- E. **Solución de albumina acida:** en 100ml de agua desionizada mezclar acetato de sodio 24mM con ácido acético 79mM y albúmina de suero ovino al 0,1% (P/V) que contiene H. Ajustar a pH 3.75 a 37°C utilizando HCl 5N.
- F. **Solución de hialuronidasa:** inmediatamente antes de usar preparar una solución que contenga 3-5 unidades/ml en el reactivo D, en frío.
- G. **Solución de hialuronidasa estándar.** Inmediatamente antes de usar, preparar una solución que contenga 10 unidades de Hialuronidasa estándar por ml en reactivo D, en frío.
- H. Seguir el siguiente esquema de pipeteo.



	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	blanco	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Reactivo F Enzima	1.00	0.75	0.50							
Reactivo G Estándar					0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
Reactivo D Enzima diluida		0.25	0.50	1.00	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50	0.40
Incubar a 37°C por 10 minutos.										
Reactivo C Sustrato	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

- I. Mezclar por inversión e incubar a 37 ° C durante exactamente 45 minutos.
- J. Pipetear 0,50 ml de la reacción anterior, mezcla en una cubeta que contiene 2,5 ml de reactivo E (solución de albúmina ácida). Mezclar inmediatamente por inversión y dejar reposar las cubetas a temperatura ambiente durante exactamente 10 minutos.
- K. Leer la absorbancia a 600nm en el espectrofotómetro versus el blanco.
- L. Leer la absorbancia de las pruebas frente al mismo blanco.

**Cálculos.**

$$\text{Absorbancia de prueba } i - \text{Absorbancia de blanco} = \text{Absorbancia neta } i \quad \text{Ec. 6}$$

$$\text{Absorbancia neta } i - \text{Absorbancia neta } j = \Delta \text{Absorbancia } i \quad \text{Ec. 7}$$

$$\frac{\text{Absorbancia neta } i}{\text{Absorbancia neta } j} = \frac{(\text{Absorbancia neta } i \cdot h \cdot \text{Factor de dilución}) \cdot (\text{DF})}{\text{Absorbancia neta } j \cdot h \cdot \text{Factor de dilución}} \quad \text{Ec.8}$$

**DF:** factor de dilución

**Alícuota de enzima:** volumen en mililitros de enzima usados en el ensayo

$$\frac{\text{Volumen de alícuota}}{\text{Volumen total}} = \frac{\text{Volumen de alícuota}}{\text{Volumen total}} \quad \text{Ec.9}$$



## 2.7. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA.

En los mamíferos existen dos formas de enzima xantina que son funcionalmente distintas entre sí; la xantina dehidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO), son codificadas por el mismo gen. La xantina oxidasa se localiza en el citosol y en la superficie de la membrana celular, es detectable en plasma, leucocitos, macrófagos, en las células parenquimatosas de varios tejidos como el intestino delgado, hígado, pulmón y en el endotelio vascular de arterias, venas y endocardio. Esta enzima cataliza varios procesos y oxida a varios sustratos endógenos y exógenos, participa en el metabolismo de las purinas mediante la degradación de los ácidos nucleicos, cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y luego a ácido úrico, con la consecuente producción del anión superóxido (Camps, 2010).

El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas, y debe ser excretado por los riñones, sin embargo, si existe alguna alteración a nivel renal se produce la acumulación de ácido úrico en la sangre (hiperuricemia), síntoma principal en la enfermedad de la gota, considera un tipo de artritis que se caracteriza por la formación y acumulación de cristales de urato de sodio en el tejido, especialmente en las articulaciones, estos depósitos son visibles y palpables denominados tofos y presentan dolor agudo, enrojecimiento, y sensibilidad.

Por lo tanto, la xantina oxidasa es la enzima clave en la patogénesis de la gota, y los tratamientos farmacológicos presentan como mecanismo principal la inhibición de esta enzima.

A la xantina oxidasa, también se la involucra en otras patologías como la insuficiencia cardíaca, por ser una fuente importante de radicales libres. En varios estudios se ha observado un aumento de la actividad de la XO y su inhibición disminuye la producción de radicales libres, el consumo de oxígeno y mejora la función ventricular. Por ende, la XO además de disminuir los niveles de ácido úrico, tiene un efecto antiinflamatorio sobre el sistema cardiovascular (Latorre et al., 2008).

El ensayo de la inhibición de la xantina oxidasa se realiza por medio de un espectrofotómetro.

**Reactivos:** Xantina (Sigma), xantina oxidasa (Sigma), Alopurinol (Sigma)

Se utilizan extractos etanólicos o metanólicos de las especies vegetales o animales a analizar.



### **Procedimiento:**

1. Preparar una solución de prueba, para llegar a una concentración final de 100ug/mL de extracto de cada especie a analizar, utilizando un agente tensoactivo (dimetilsulfoxido), para lograr la disolución total.
2. Luego preparar una solución de buffer fosfato, utilizando  $\text{NaHPO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  para obtener buffer fosfato 70mM, a pH 7,5.
3. Después preparar la solución de la enzima (Xantina Oxidasa) a una concentración de 0,2 UI/uL
4. Preparar la solución del sustrato (Xantina) hasta llegar a una concentración de 150Um.
5. Colocar en un tubo de ensayo 330ul de la solución del extracto de cada especie, más 970 ul de buffer fosfato, más 30 ul de la solución de la enzima. Este tubo será de la MUESTRA.
6. En otro tubo preparar el BLANCO DE LA MUESTRA, colocar 330ul de la solución del extracto y 1000ul de buffer fosfato.
7. En otro tubo realizar el CONTROL, agregar 330ul de agua ultrapura, 970 ul de buffer fosfato y 30ul d la solución de la enzima.
8. En otro tubo se coloca, 330ul de agua ultrapura y 1000ul de buffer fosfato, formando así el BLANCO DEL CONTROL.
9. En total son cuatro tubos por cada extracto a analizar; éstos tubos se incuban por 15 minutos a 30°C.
10. Para iniciar la reacción se agrega 670ul de sustrato (xantina), e incubar nuevamente por 30 minutos más.
11. Trascurrido este tiempo, se detiene la reacción agregando 330ul de HCl 1N.
12. Inmediatamente se lee en un espectrofotómetro a 290nm (Gutiérrez & Mamani, 2011).

### **Conclusiones y observaciones.**

Mediante esta técnica se validan compuestos de extractos vegetales que presenten actividad antiinflamatoria ytambién actividad antigotosos. Esta técnica es relativamente sencilla y fácil de realizar por la disponibilidad de los reactivos.



## **2.8. INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADA CON LIPOSACÁRIDOS (LPS).**

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, bio-sintetizado en el organismo en pequeñas cantidades a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina que es convertido en L-citrulina mediante la intervención de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El NO cumple la función de vasodilatador, agente antiaterogénico y antiagregante plaquetario. La NOS tiene alta afinidad por su sustrato: la arginina, ésta se encuentra en altas concentraciones en el endotelio, la funcionalidad de esta enzima está determinada por la concentración de arginina, productos de sus ingresos nutricionales (Duarte et al., 2008; Silva et al., 2011).

Existe una variedad de isoformas de NOS, agrupadas en dos categorías, la NOS constitutiva (cNOS) y la NOS inducible (iNOS). La cNOS es dependiente de iones calcio y calmodulina, comprende la NOS neural (nNOS, tipo I), presente en las neuronas y la NOS endotelial (eNOS tipo III), presente en las células endoteliales vasculares y en las plaquetas, mientras que la iNOS es producida por macrófagos y otras células como linfocitos T, células endoteliales, miocitos, hepatocitos, condrocitos, neutrófilos y plaquetas, activadas por citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  y LPS, esta isoforma requiere de algunas horas para ser expresada, por lo tanto una vez sintetizada, libera cantidades mayores de NO que la cNOS.

El NO resultante de la eNOS, cumple funciones importantes en la protección del vaso sanguíneo para mantener el tono vascular, regulación de la presión sanguínea, prevención de la agregación plaquetaria, inhibición de la adhesión de monocitos y neutrófilos al endotelio vascular. Por otro lado, el NO resultante de la activación de la iNOS presenta actividad citotóxica y citostática promoviendo la destrucción de microorganismos, parásitos y células tumorales.

El NO participa en todos los procesos biológicos del organismo, sin embargo, en grandes cantidades puede actuar de forma perjudicial para los tejidos. Actualmente varios estudios han citado al NO como factor etiológico de la enfermedad periodontal, el cual es de naturaleza inflamatoria y multifactorial, en base a esto muchos investigadores consideran que inhibir la producción de NO como una estrategia terapéutica en los procesos inflamatorios (Silva et al., 2011).



## **Test de viabilidad celular.**

### **Procedimiento.**

La producción de NO por macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS se evalúa midiendo la concentración de nitritos presentes en el medio de cultivo, mediante una reacción colorimétrica empleando el reactivo de Griess.

### **Cultivo de las células.**

1. Incubar las células de macrófagos RAW 264.7 en cultivo de tejidos, en frascos que contienen medio de Eagle de Dulbecco (DMEM), 10% de suero bovino fetal (FBS), estreptomycin y penicilina (100 U/l), en atmósfera humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.
2. Decantar el medio y añadir 1 ml de tripsina al 0,25% y mantener en la incubadora durante 5 min.
3. A continuación, golpear o agitar suavemente el matraz para separar las células, luego enjuagar completamente el matraz agregando 3 ml del medio DMEM-FBS y centrifugar el contenido a 1000 rpm durante 10 min.
4. Descartar el sobrenadante, y disolver las células del sedimento en medio DMEM-FBS.
5. Para evaluar la viabilidad del tripsinizado de las células RAW 264.7 se realiza una tinción con una solución de tinción de azul tripán al 0,4% (1: 4) diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cuentan las células utilizando una cámara de Neubauer.
6. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos incubar la línea celular RAW264.7, colocar  $5 \times 10^4$  células por pocillo, durante 24 horas en medio de cultivo, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).
7. Adicionar los extractos a analizar en diferentes concentraciones (10, 25, 50ug/ml) e incubar durante 24 horas.
8. Después del tratamiento descartar el medio de cultivo y añadir 10 ug/ml de LPS e incubar por 18 horas a 37°C.

### **Producción de NO.**



1. Para determinar la concentración de NO en el medio de cultivo se determina mezclando 100ul del sobrenadante del cultivo con 100ul de reactivo de Griess durante 5 minutos.
2. Luego, determinar la absorbancia a 550nm.
3. Como blanco se utiliza medio de cultivo fresco.
4. La cantidad de nitrito en cada muestra se calcula usando una curva estándar preparada con nitrito de sodio.

**Cálculos.** El porcentaje de inhibición en la producción de NO se expresa como:

$$[1 - (\text{Absorbancia muestra} / \text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia blanco})] \times 100 \text{ Ec.6}$$

(Saravanan et al., 2015; Velásquez & Posada, 2013).

### **Conclusiones y observaciones.**

La aplicación de esta técnica presenta una alta prevalencia para valorar la actividad anti inflamatoria *in vitro* de extractos vegetales, ya que los macrófagos son las células que forman parte del sistema inmunitario innato y al ser estimulados con LPS pueden generar una variedad de mediadores inflamatorios, como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina 1β (IL-1β) y factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Por lo tanto, al aplicar esta técnica se pueden determinar todos los mediadores antes mencionados.

### **2.9. INHIBICIÓN DE LA ELASTASA.**

Los neutrófilos PMN son células fagocíticas involucradas en mecanismos de defensa contra infecciones y desempeñan papeles de defensa en los procesos inflamatorios, cuando existe un factor quimiotáctico se activan estas células y como consecuencia se liberan especies reactivas de oxígeno (ERO) y enzimas proteolíticas como la elastasa que es una metaloproteína capaz de degradar el colágeno, los proteoglicanos del cartílago, la elastina y la membrana basal. Además, puede convertir el fibrinógeno en fibrina y actuar sobre el complemento a distintos niveles (Cárdenas et al., 2012; Durán Lengua et al., 2014).

Los leucocitos presentan el receptor formil péptido (FPR), el cual participa en varias funciones importantes, como la activación de la fagocitosis, adhesión, migración, Quimiotaxis y actividades bactericidas por medio de la desgranulación de PMN y el estallido



respiratorio con la consecuente liberación de ERO. Estas acciones son benéficas, sin embargo, cantidades excesivas de estas especies oxidantes causa daño al tejido durante el proceso inflamatorio. Por ende, desarrollar o descubrir moléculas que inhiban la función del FPR, podría considerarse como mecanismo de acción de nuevos agentes antiinflamatorios (Durán Lengua et al., 2014).

### **Técnica 1. Inhibición de la elastasa.**

En esta técnica se cuantifica la elastasa liberada de los PMN sometidos a exocitosis, activados por citocalasina B y estimulados con fMLP.

### **Separación de neutrófilos humanos.**

1. Extraer sangre venosa en tubos con heparina de voluntarios sanos, para obtener los neutrófilos.
2. Después, mediante sedimentación espontánea por 30 min, recolectar el plasma y adicionar cuidadosamente sobre ficoll- histopaque, el cual actúa por gradiente de densidad a una proporción 1:2 v/v someter a centrifugación por 20 min.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender los PMN del sedimento en 0,5ml de PBS.
4. Añadir cloruro de amonio 0,83% pH 7,2 para lisar los eritrocitos contaminantes.
5. Lavar los PMN tres veces con solución amortiguadora (PBS) pH 7,3 y adicionar 0,50mM de glucosa.
6. Resuspender para obtener una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml

### **Determinación de la inhibición de la elastasa.**

7. Colocar en la microplaca, 200ul de PBS, y los PMN ( $2 \times 10^6$  células/ml).
8. Inducir a los PMN a exocitosis, activados por citocalasina B y estimulados con fMLP.
9. La elastasa liberada fue expuesta a las diferentes concentraciones de los extractos por 10 min.
10. Posteriormente adicionar 10  $\mu$ M SAAVNA y se incubó por 30 min a 37 °C.
11. Realizar la lectura de las absorbancias en un lector de microplaca a una longitud de onda de 405 nm.
12. El control del 100 % de actividad consiste en  $2,5 \times 10^6$  PMN con el mismo tratamiento, pero sin adición de los extractos.



- 13. El ensayo se controla con 0,5 μM de fenilbutazona en agua destilada estéril, el cual muestra una inhibición de la enzima de 95 %.
- 14. Los ensayos se realizan por triplicado y tres repeticiones para cada ensayo (Durán Lengua et al., 2014).

**Técnica 2. Técnica espectrofotométrica de la elastasa pancreática**

Se utiliza N-succ-(ala)-3-p-nitroanilina como sustrato y se monitorea la liberación de p-nitroanilina por 20 min a 25 °C. La cantidad de p-nitroanilina se determina midiendo la absorbancia a 410 nm.

- 1. Las muestras de extractos metanólicos deben tener una concentración final de 0,125g/mL.
- 2. El sustrato se prepara con N-succinil- (Ala) 3-p-nitroanilina, una concentración de 1,015 mM, disuelta en 0,1 M de Tris-HCl a pH 8
- 3. La elastasa pancreática porcina, se disuelve con buffer Tris-HCl 0,2 M (pH 8) para llegar a tener una concentración final de la enzima de 0,046 U/mL.
- 4. Las reacciones se llevan a cabo adicionando en placas de 96 pozos 10 μL del extracto de cada una de las muestras, 10 μL de elastasa y 130 μL del sustrato, para tener un volumen final de reacción de 150 μL.
- 5. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**Cálculos.**

La capacidad antiinflamatoria se expresa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100 \quad \text{Ec.7}$$

En dónde:

A: son los μg/mL de p-nitroanilina liberados sin inhibidor (10 μL de metanol, 10 μL de elastasa, y 130 μL del sustrato)

B: μg/mL de p-nitroanilina liberados en presencia del inhibidor (sistema de reacción con extracto en lugar del metanol) (Dávalos et al., 2013).



## 2.10. INHIBICIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $\alpha$ INDUCIDO POR EL FACTOR NUCLEAR KAPPA B

El NF- $\kappa$ B es un complejo proteico que regula la transcripción del ADN y participa en la respuesta inmune e inflamatoria, en el desarrollo, formación, progresión y apoptosis de tumores. Se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a proteínas inhibidoras, las cuales son fosforiladas y degradadas para permitir la liberación del NF- $\kappa$ B que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes diana. Los genes diana del NF- $\kappa$ B son las citocinas, factores de crecimiento, receptores solubles de citocinas, proteínas de estrés, moléculas de adhesión y moléculas inmunoreguladoras.

Generalmente el NF- $\kappa$ B es activado por ciertos estímulos como lipopolisacáridos bacterianos, ésteres de forbol, virus, estrés oxidativo, luz ultravioleta, radiación ionizante y drogas genotóxicas (Echeverría & Mockus, 2008; Escárcega, 2010).

Existen diversas técnicas que evalúan la actividad antiinflamatoria *in vitro* en la que participa el NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, mediante la inhibición del NF- $\kappa$ B se determina el porcentaje de inhibición del Factor de Necrosis tumoral  $\alpha$  en células 293T humanas y también se puede determinar el porcentaje de liberación del factor de Necrosis tumoral  $\alpha$ , a partir de células de leucemia monocítica estimuladas con LPS, a continuación, se describe el procedimiento de cada una de las técnicas.

### **Procedimiento.**

Se utilizan células 293T humanas para medir la inhibición de NF- $\kappa$ B.

1. Cultivar las células en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal, L-glutamina y penicilina-estreptomicina a 37°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub>.
2. Para medir la supervivencia celular, se siembra en placas de 96 pocillos y se cultivan durante la noche.
3. Incubar las células en nuevos medios que contengan diversas concentraciones de extractos vegetales durante 24 h más.
4. La viabilidad celular se probó mediante la cuantificación de ATP celular utilizando el ensayo de luciferasa/luciferina de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
5. Para medir la inhibición de NF- $\kappa$ B, sembrar las células (1105/ ml) en una placa de 24 pocillos y cultivar durante la noche.
6. Reemplazar el medio por medio sin suero durante 4 h.



7. Añadir TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) y extractos vegetales (2 mg/ml) en cada pocillo y cultivar durante 1 h.
8. Extraer proteínas de células completas, y la actividad de unión de NF- $\kappa$ B a su sitio de unión se realiza usando un kit ELISA.
9. Calcular la actividad de unión de cada muestra utilizando una curva estándar.

#### **2.10.1. Liberación de TNF- $\alpha$ a partir de células de leucemia monocítica estimuladas con LPS.**

1. Cultivar las células de leucemia monocítica humana (THP-1) en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) que contiene 4,5 g/l de D-Glucosa y suplementado con 2 mM GlutaMax, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 10% de suero fetal bovino a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en 95% aire.
2. Las células son sembradas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo e incubadas durante 48 h en forbol-12-miristato-13-acetato (PMA 100 nM).
3. Eliminar las células no adheridas a los pocillos con medio fresco.
4. Pre incubar las células restantes con diferentes concentraciones de extractos durante 1 hora.
5. Estimular las células con lipopolisacárido (50ng/ml) e interferón gamma (50 unidades) durante 24 h.
6. Determinar la concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo de THP-1 mediante un ELISA tipo sándwich comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **Conclusiones y observaciones.**

Estas técnicas son más complejas que las descritas anteriormente, ya que se requiere de kits comerciales adicionales para determinar la inhibición de la actividad antiinflamatoria y por ende son más costoso. Sin embargo, estas técnicas simulan de manera semejante los procesos que suceden en nuestro organismo cuando se produce el proceso inflamatorio.

#### **2.11. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1.**

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 o CD54) es una glicoproteína que está presente en bajas concentraciones en la mayoría de las células endoteliales, linfocitos T y B,



y monocitos. Es un receptor funcional que tiene la capacidad de transducir señales al interior de las células al interactuar con sus ligandos, desencadenando diferentes eventos funcionales celulares como la expresión génica, cambios fenotípicos de inducción y/o sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular.

La expresión de ICAM-1 es inducida mediante estimulación por citocinas como Interleucina-1 (IL-1) y Factor de Necrosis Tumoral (FNT). Sin embargo, en los casos de inflamación aguda y crónica, es expresada en células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, condrocitos y células epiteliales; lo cual incrementa la interacción entre célula-célula y la extravasación de los leucocitos hasta el sitio de la inflamación. La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación. Este proceso está mediado por la molécula de adhesión E-selectina. La unión firme y la migración transendotelial dependen de la interacción entre la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Macías Abraham, 2006; Macías et al., 2003; Villarroel Dorrego, 2015)

#### **Procedimiento.**

1. Las HUVEC (células endoteliales de vena de cordón umbilical) se cultivan en placas de 96 pocillos medio DMEM bajo en glucosa que contiene suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Mantener los cultivos 37°C y a 5% CO<sub>2</sub>.
2. Después de alcanzar una etapa subconfluente, las células son tratadas con varias concentraciones de los extractos (50-200 mg/mL disueltos en medio de cultivo sin suero) y 10 mM de ácido acetilsalicílico y mantener en cultivo durante 2 h.
3. Después de esto, los extractos son descartados.
4. Al grupo experimental añadir 50 ng/mL de TNF- $\alpha$  disuelto en medio con suero al 10% y otro grupo añadir sólo el medio con suero al 10%.
5. Las células cultivadas en el medio de cultivo no tratadas con extracto, pero estimuladas con TNF-a y las células no tratadas y no estimuladas se usaron como controles.
6. Después de 20 h de incubación, tomar los sobrenadantes para medir la expresión de moléculas de adhesión mediante un kit ELISA. Todas las muestras se analizan por triplicado (Grigore et al., 2013).
- 7.



**Conclusiones y observaciones.**

Esta técnica también es compleja y costosa porque se necesita de otros kits comerciales para complementar la técnica. Por lo tanto, no es muy utilizada para investigaciones de extractos vegetales con principios activos antiinflamatorios.



## CAPÍTULO III

## 3. METODOLOGÍA

**3.1. Diseño y tipo de estudio.**

El presente trabajo es una revisión sistematizada de la literatura que tiene como objetivo investigar sobre las técnicas de evaluación de la actividad antiinflamatoria “*in vitro*” y su aplicabilidad a plantas medicinales”.

**3.2. Estrategia de búsqueda.**

La búsqueda de información bibliográfica para la elaboración de este trabajo se realizó en documentos y artículos de libre acceso indexados a bases de datos como Pubmed, SciELO, Scencedirect, SpringerLink, Medline, y Google académico, empleando palabras claves como “antiinflammatory activity”, “*in vitro*”, “extractos vegetales”, “plantas naturales” además se emplearon operadores booleanos como AND, y OR. La ecuación de búsqueda fue: (“anti inflammatory activity” OR “antiinflammatory activity”) AND (“*in vitro*”), la misma fue utilizada en cada una de las bases digitales. Se recuperaron un total de 1255 publicaciones en la búsqueda inicial, divididas de la siguiente manera:

Google académico: 1000
Scencedirect: 132
SpringerLink: 70
SciELO: 51
Pubmed: 2
Medline: 0

**3.3. Evaluación.**

Para evaluar cada una de las publicaciones encontradas se aplicaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

**Criterios de inclusión:**

- Publicaciones que mencionen técnicas anti-inflamatorias “*in vitro*”
- Bibliografía escrita en español o en inglés publicada entre el 2010 y el 2020.
- Artículos originales, capítulos de libros, artículos de revisión, y trabajos de titulación.



**Criterios de exclusión:**

- Publicaciones que mencionen técnicas anti-inflamatorias realizadas de manera *in vivo*.
- Bibliografía publicada en años anteriores al 2010.
- Artículos que no permitan el acceso a información completa.

Al aplicar los criterios de inclusión y exclusión y eliminar las publicaciones repetidas se obtuvieron un total 100 publicaciones finales, que serán objeto de revisión.

**3.4. Análisis de la información:**

Las 100 publicaciones encontradas forman parte de la revisión y posteriormente fueron analizadas de manera minuciosa, para extraer información relevante sobre la metodología, ventajas, desventajas y su aplicabilidad en plantas medicinales.

Las técnicas encontradas con sus ventajas y desventajas se resumieron en tablas, así como también su aplicabilidad en plantas medicinales.

## RESULTADOS

En esta revisión sistematizada se encontraron cien artículos originales que describen diferentes técnicas antiinflamatorias “*in vitro*”. Entre ellas, la técnica más utilizada fue la inhibición de la producción de óxido nítrico por los macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos, seguido de la técnica de estabilización de la membrana eritrocitaria, la inhibición de la desnaturalización de proteínas, y las técnicas menos utilizadas son la inhibición de enzimas como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la fosfolipasa A2, la elastasa, la hialuronidasa y la xantina oxidasa. Todas éstas técnicas se pueden aplicar en laboratorios de investigación y docencia ya que no requieren de equipos ni condiciones especiales. Sin embargo, se necesita de un espectrofotómetro ya que en todas las técnicas se mide la absorbancia a distintas longitudes de onda, de la muestra previamente analizada. Por otro lado, el escogimiento de una u otra técnica dependerá de los recursos del investigador, y de los materiales y reactivos disponibles. El uso de kits comerciales resulta costoso, sin embargo, solo se aplican las instrucciones del fabricante y no hay que ajustar ningún parámetro porque ya están estandarizados. Por lo que el investigador debe conocer las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas, para seleccionar la técnica más adecuada para aplicar en su investigación.

**Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas de evaluación antiinflamatoria “*in vitro*”.**

<b>TÉCNICA</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>ENSAYO DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA.</b> <b>Fundamento:</b> la membrana eritrocitaria es análoga a la membrana lisosomal, al proteger la integridad de la membrana de los lisosomas de los	-Sencillo y fácil de realizar por la alta disponibilidad de glóbulos rojos humanos. -Los reactivos son fáciles de conseguir o preparar, por lo tanto, se considera un método económico. -Su actividad antiinflamatoria se debe a su acción estabilizadora de la membrana.	- Es un ensayo indirecto, pues no interviene en sí en el proceso de la inflamación. - No es una técnica precisa. -Se deben monitorizar varios parámetros como: tiempo y temperatura,



<p>mastocitos y neutrófilos, se impide la liberación de mediadores de la inflamación.</p>	<p>-Método utilizado para valorar primera etapa de la inflamación. -Método fácilmente reproducible. -Este método es bastante utilizado para determinar la actividad antiinflamatoria en extractos vegetales, animales y en compuestos sintéticos.</p>	<p>concentración (V/V) de eritrocitos, pH de los búferes, etc.</p>
<p><b>INHIBICIÓN DE LA DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA/ desnaturalización térmica de la albúmina.</b></p> <p><b>Fundamento:</b> la desnaturalización de proteínas es un proceso que ocurre con frecuencia en el proceso inflamatorio; por diversas causas, por estrés, cambios bruscos de pH, contacto con disolventes orgánicos, calor etc. Por lo tanto, la determinación de la desnaturalización de la albúmina es una medida del potencial antiinflamatorio</p>	<p>-Método sencillo y rápido de realizar, por la disponibilidad de la albúmina. -Materiales y reactivos elementales en cualquier laboratorio de docencia e investigación. -Cálculos simples, con aplicación de una fórmula. -Método fácilmente reproducible. -También, este método es bastante utilizado para determinar la actividad antiinflamatoria en extractos de plantas, animales y en compuestos sintéticos,</p>	<p>-Ensayo que valora el proceso inflamatorio de manera indirecta, pues se considera que la desnaturalización de proteínas tisulares conduce a enfermedades inflamatorias. -Generalmente se realiza junto al ensayo de estabilidad de la membrana. -No es un método específico.</p>



<p>de extractos vegetales y compuestos sintéticos.</p>		
<p><b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LIPOOXIGENASA (LOX).</b></p> <p><b>Fundamento:</b> mediante esta técnica se detecta y mide los hidroperóxidos producidos en la reacción de oxigenación mediante una enzima lipooxigenasa purificada. La reacción de detección es igualmente sensible a los hidróxidos en cualquier posición dentro del ácido graso y funcionará en cualquier ácido graso sin importar su longitud.</p>	<p>-Método relacionado directamente con la inhibición de la enzima que metaboliza el ácido araquidónico para generar mediadores de la inflamación.</p> <p>-El ensayo se realiza utilizando kits comerciales que determinan inhibidores de la enzima 15-lipooxigenasa (15-LOX).</p> <p>-Se puede utilizar el linoleato o araquidonato como sustratos de esta enzima para determinar inhibidores de la 15-LOX.</p> <p>-El ensayo se realiza por la técnica de ELISA que presenta la característica de una alta especificidad y sensibilidad, que puede procesar gran número de muestras simultáneamente y proporciona resultados rápidos.</p> <p>-También, la actividad inhibidora de la lipoxigenasa se puede determinar utilizando el método espectrofotométrico .</p>	<p>- Los kits comerciales son costosos.</p> <p>- Al seguir las instrucciones del fabricante, no es posible realizar modificaciones en el ensayo, caso contrario se tendría que validar el nuevo protocolo.</p>



	<ul style="list-style-type: none"><li>- Con este ensayo quedan de lado los resultados subjetivos, pues su cuantificación se realiza mediante un espectrofotómetro que evalúa el cambio de coloración que resulta de la reacción enzima-sustrato.</li><li>-Al utilizar kits comerciales, existen pocos errores puesto que las variables fueron estandarizadas, de modo que los parámetros medidos no sean alterados.</li></ul>	
<p><b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ENZIMAS PRO-INFLAMATORIAS (INHIBICIÓN DE LA FOSFOLIPASA A2)</b></p> <p><b>Fundamento:</b> se considera que la fosfolipasa A2 es una enzima pro-inflamatoria, al inhibir enzima, denota que la respuesta antiinflamatoria no está afectada a nivel del ácido araquidónico.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Ensayo que permite inhibir la enzima que origina el proceso inflamatorio.</li><li>- También se utilizan kits comerciales.</li><li>- El ensayo es aplicado en extractos vegetales, animales o en compuestos sintéticos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- No es un método bastante aplicado para valorar actividad antiinflamatoria.</li><li>-Los kits comerciales son costosos.</li></ul>



<p><b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA (COX).</b></p> <p><b>Fundamento:</b> el ensayo es cromatogénico y se basa en la oxidación de N'-tetrametil-p-fenilendiamina más conocido como TMPD durante la reducción de Prostaglandina-G2 (PG-G2) a Prostalglandina-H2 (PG-H2). Y el cambio de color se mide mediante espectrofotometría. La reacción inicia mediante la adición de ácido araquidónico y TMPD.</p>	<p>-Se considera un método directo, porque inhibe la enzima inductora de prostaglandinas causantes de la inflamación.</p> <p>-La actividad inhibitoria se evalúa mediante inmunoensayo enzimático usando un estuche comercial.</p> <p>-En el ensayo se puede utilizar COX humana y/o COX ovina.</p> <p>-Existen diferentes métodos para detectar un inhibidor de la COX, puede ser mediante detección colorimétrica o fluorescente, aunque no son muy utilizados.</p> <p>-En el ensayo colorimétrico de detección de inhibidores de la COX incluye enzimas COX-1 y COX-2 ovinos para manifestar inhibidores específicos de las isoenzimas.</p>	<p>-Cualquier antioxidante podría interferir en el ensayo y considerarse un inhibidor de la COX, por ende, dar un resultado falso positivo.</p> <p>- Costo elevado del kit comercial.</p> <p>- Depende de la COX que se quiera inhibir se aplicará el kit, puede ser de manera general para COX, o para determinar inhibidores selectivos de la COX-2.</p>
<p><b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ELASTASA</b></p> <p><b>Fundamento:</b> en esta técnica se cuantifica la elastasa liberada de los PMN sometidos a exocitosis, activados</p>	<p>-Sencillo y fácil de realizar en cualquier laboratorio, por la alta disponibilidad de neutrófilos.</p> <p>- Fácilmente reproducible.</p>	<p>- Método indirecto para evaluar la actividad antiinflamatoria.</p> <p>- No es un método muy utilizado.</p> <p>- No es un método representativo que valore la actividad antiinflamatoria.</p>



<p>por citocalasina B y estimulados con fMLP.</p>		
<p><b>ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA.</b></p> <p><b>Método espectrofotométrico.</b></p> <p><b>Fundamento:</b> la inhibición de la hialuronidasa se determina por espectrometría utilizando hialuronidato de potasio como sustrato, y hialuronidasa como enzima, mediante la detección del grupo final de N-acetil glucosamina liberado, utilizado un compuesto colorimétrico como es el p-dimetil-amino-benzaldeído.</p> <p><b>Método turbidimétrico.</b></p> <p><b>Fundamento.</b></p> <p>En este método se utiliza al ácido hialurónico como sustrato, y la hialuronidasa como enzima, y se valora el ácido hialurónico no digerido mediante precipitación con albumina</p>	<p>-La determinación de la actividad de la hialuronidasa se puede realizar mediante espectrofotometría de absorción, turbidimetría y mediante el método colorimétrico basado en la reacción de Morgan-Elson.</p> <p>-La inhibición de la enzima hialuronidasa constituye un método confiable y preciso.</p> <p>-Al realizar este método se evita el sacrificio de animales su experimentación.</p> <p>- Método fácilmente reproducible.</p> <p>- Se utiliza kits comerciales.</p> <p>- Método confiable.</p> <p>- Método establecido en la USP XXII-NFXVII.</p>	<p>-No es un método muy utilizado.</p> <p>-Este método valora la actividad antiinflamatoria de manera indirecta, ya que no inhibe las enzimas que participan en el proceso inflamatorio.</p> <p>- No es el método de primera elección para valorar actividad antiinflamatoria en extractos vegetales o animales.</p> <p>-No es un método bastante aplicado.</p> <p>-Método muy antiguo (1990).</p>



bovina acida, midiendo su absorbancia a 600nm.		
<p style="text-align: center;"><b>INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS).</b></p> <p><b>Fundamento:</b> los macrófagos son cultivados y estimulados con LPS y se determina la liberación de mediadores mediante kits comerciales ELISA</p>	<p>-Mediante este ensayo de pueden determinar varios mediadores de la inflamación como iNOS, PGE y el FNT<math>\alpha</math>.</p> <p>-Técnica bastante aplicada por los investigadores en la búsqueda de principios activos con actividad antiinflamatoria.</p> <p>- Se puede aplicar en extractos vegetales, animales y compuestos naturales o sintéticos.</p>	<p>-Técnica altamente costosa, por el cultivo de las células y porque requiere de kits adicionales para finalizar el estudio.</p> <p>-Este ensayo es demorado, ya que se necesita un tiempo extra para el cultivo celular.</p>
<p style="text-align: center;"><b>ENSAYO DE LA XANTINA OXIDASA (XO)</b></p> <p><b>Fundamento:</b> es un método enzimático que mediante espectrofotometría se analiza la inhibición de la xantina oxidasa, y utilizando la xantina como sustrato</p>	<p>- El ensayo permite determinar principios activos con actividad antiinflamatoria y que también sean útiles para el tratamiento de la gota.</p> <p>- Ensayo de fácil reproducibilidad en cualquier laboratorio de investigación.</p> <p>-El ensayo se realiza en poco tiempo, es decir en el mismo día se obtienen los resultados, en comparación con otros métodos que necesitan tiempo para los cultivos celulares</p>	<p>- El ensayo no es exclusivo para valorar actividad antiinflamatoria.</p> <p>-El costo de reactivos es alto.</p>



	-Se puede aplicar en extractos vegetales, animales y en compuestos sintéticos.	
<p><b>INHIBICIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL <math>\alpha</math> INDUCIDO POR EL FACTOR NUCLEAR KAPPA B.</b></p> <p><b>Fundamento:</b> mediante inhibición del NF-Kb, se determina la expresión del TNF <math>\alpha</math> mediante el uso de kits comerciales</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El ensayo permite evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos vegetales y animales, mediante la inhibición del NF-Kb que permite la inhibición de mediadores de la inflamación.</li> <li>- Con este método se valora la expresión de los mediadores de la inflamación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No es un método muy utilizado por el costo y el tiempo.</li> <li>- Además, se necesita de otros kits comerciales para determinar la expresión de NF-Kb.</li> <li>- Método poco reproducible.</li> </ul>
<p><b>DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1.</b></p> <p><b>Fundamento:</b> en este ensayo se estimula con TNF las células endoteliales de vena de cordón umbilical y se determina mediante un kit ELISA la expresión de las moléculas de Adhesión 1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicado para extractos vegetales, animales y compuestos naturales y sintéticos.</li> <li>- Esta técnica valora la etapa de adhesión de los leucocitos al endotelio, ya que mediante la ICAM-1 los leucocitos se adhieren al endotelio vascular para permitir la extravasación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método poco aplicado para evaluar la actividad antiinflamatoria.</li> <li>- Técnica muy demorada, los resultados se obtienen pasadas las 24 horas.</li> <li>- Costo elevado de los reactivos.</li> </ul>

Elaborado por la autora.



### APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA VALORAR ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

Esta revisión sistematizada dio como resultado el hallazgo de cien estudios que mencionan técnicas antiinflamatorias “*in vitro*”. Cada estudio emplea dos, tres y hasta cuatro técnicas “*in vitro*”, sin embargo, algunos estudios también incluyen técnicas antiinflamatorias “*in vivo*” para descubrir el potencial antiinflamatorio de la muestra a analizar. Al aplicar más de una técnica antiinflamatoria el investigador compara, valida y confirma que dicha muestra presenta características antiinflamatorias y quede como base para futuras investigaciones de su potencial. La mayoría de técnicas aplicadas utilizan extractos vegetales, preparaciones herbales, extractos de hongos, compuestos sintéticos o compuestos naturales. Asimismo, la mayoría de los ensayos realizan estudios fitoquímicos para identificar el o los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria. A continuación, se presentan tablas que resumen las plantas medicinales con actividad antiinflamatoria, metabolitos secundarios, resultados y la o las técnicas utilizadas en la evaluación de la actividad.

**Tabla 3. Aplicaciones del ensayo de estabilización de membrana eritrocitaria (HRBC).**

<b>TÉCNICA APLICADA</b>	<b>PLANTAS MEDICINALES</b>	<b>METABOLITOS IDENTIFICADOS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
	Extracto de hoja de: <i>Boswellia serrata</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Terpenos y esteroides</li><li>- Saponinas</li><li>- Taninos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Carbohidratos</li></ul>	Los extractos de <i>B. serrata</i> a diferentes concentraciones (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml) mostraron estabilización significativa de la membrana de los eritrocitos. El efecto antiinflamatorio de este extracto puede deberse a la presencia de flavonoides y	(Afsar et al., 2012)



Ensayo de estabilización		- Glucósidos.	saponinas. El mayor porcentaje de protección del extracto metanólico fue a 2000 µg/ml.	
de membrana eritrocitaria (HRBC).	Extractos etanólicos de: - <i>Croton lechler</i> - <i>Chenopodium ambrosioides</i> - <i>Peperomia congona</i> - <i>Perezia coeruleascens</i>		El extracto de <i>P. congona</i> tiene el mayor porcentaje de hemólisis, y el extracto de <i>C. lechleri</i> tiene el menor porcentaje de hemólisis en las concentraciones de 200 ug/mL; 100 ug/mL, y 50 ug/mL. Mientras que, con respecto al porcentaje de protección de los diferentes extractos, se observa que el extracto de <i>C. lechleri</i> tiene mayor porcentaje de protección en un 43,2±0,9%; seguido de <i>Chenopodium ambrosioides</i> , en un 41,8±2,2% a la concentración de 200 ug/mL, mientras que el grupo control dexametasona, la actividad antiinflamatoria representa el 42,8±1,4% a la concentración de 200 ug/mL.	(Acostupa et al., 2017)
	Extracto de hojas de: - <i>Pelargonium hispidum</i> - <i>P. grandiflorum</i> - <i>P. radens</i> - <i>P. zonale</i>	- Catequinas - Flavonas - Ácidos polifenólicos - Antocianidinas.	Se analizaron los extractos de las hojas de las distintas plantas a concentraciones diferentes (39.06; 78.12; 156.25; 312.48; 625; 1250; 2500; 5000 µg/ml). Los cuales mostraron estabilización significativa de la membrana eritrocitaria. Así, el extracto de <i>Pelargonium hispidum</i> a una concentración de 625 µg/ml	(Iancu et al., 2017)



			<p>mostró el <math>99.99 \pm 0.22\%</math> de protección, en comparación con el diclofenaco a la misma concentración que presentó el <math>98.71 \pm 0.31\%</math> de protección.</p> <p>El extracto de <i>P. grandiflorum</i> a la misma concentración anterior presenta el <math>99.56 \pm 0.14\%</math> de protección.</p> <p>El extracto de <i>P. radens</i> presenta su mayor porcentaje de protección a la membrana eritrocitaria (<math>99.73 \pm 0.47\%</math>) a una concentración de <math>2500 \mu\text{g/ml}</math>, en comparación del diclofenaco a la misma concentración que presenta el <math>98.78 \pm 0.34\%</math> de protección.</p> <p>Finalmente, el extracto de <i>P. zonale</i> mostró su mayor porcentaje de protección (<math>99.59 \pm 0.25\%</math>) a una concentración de <math>1250 \mu\text{g/ml}</math> comparado con el diclofenaco a la misma concentración que presenta <math>98.65 \pm 0.34\%</math>.</p>	
Extracto de hongos del género <i>Lentinula edodes</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Ácido ascórbico</li><li>- <math>\beta</math>-caroteno</li></ul>	El extracto etanólico del hongo <i>Lentinula edodes</i> mostró actividad antiinflamatoria del	(Khaund et al., 2016)	



		- Licopeno.	50 ± 4,40% a una concentración de 10mg/mL. El fármaco estándar utilizado fue la Aspirina que mostró una mayor actividad antiinflamatoria de 81,66 ± 0,57% a la misma concentración. Por la presencia de flavonoides podría considerarse que presenta actividad antiinflamatoria leve, sin embargo, se requieren de estudios <i>in vivo</i> para confirmar su actividad farmacológica.	
	Extracto de <i>Tradescantia zembrina</i>	Compuestos fenólicos	Los dos extractos (extracto 1, que contiene compuestos fenólicos obtenidos mediante agua a ebullición; y extracto 2 obtenido de la maceración con agua a 22°C y procesamiento con etanol al 80%) fueron capaces de proteger la membrana eritrocitaria, en 32.40 y 29.42% respectivamente.	(Sánchez Chino et al., 2019)
	Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Azúcares reductores</li><li>- Aminoácidos libres</li><li>- Flavonoides</li><li>- Taninos.</li></ul>	El extracto etanólico de Marco ( <i>Ambrosia arborescens</i> ) tuvo mayor actividad antiinflamatoria 88,57% con respecto al antiinflamatorio testigo aspirina 87,66%. Sin embargo, el extracto acuoso de las hojas de	(Pérez Betancourt & Moya Castillo, 2017)



	Extracto de <i>Buddleja incana</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Flavonoides</li></ul>	Quishuar ( <i>Buddleja incana</i> ) tuvo 81,22% de actividad antiinflamatoria.	
	Extracto de hojas, tallos y flores de <i>Nyctanthes arbor-Tristis</i> .	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Saponinas</li></ul>	<p>Los extractos vegetales se obtuvieron en diferentes solventes; en hexano, metanol, y acetato de etilo. Se prepararon diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 mg/ml). La concentración y porcentaje de actividad antiinflamatoria son directamente proporcionales. El porcentaje de estabilización de la membrana eritrocitaria es alto en extractos con concentración de 10mg/ml, Así tenemos el extracto en hexano presenta un porcentaje de protección de <math>52.06 \pm 1.40\%</math>, el extracto en acetato de etilo presenta el <math>62.08 \pm 1.86\%</math> y el extracto metanólico mostró <math>56.20 \pm 1.75\%</math> de protección en comparación con el diclofenaco de sodio que presentó el <math>66.10 \pm 0.39\%</math> de protección.</p> <p>El hexano y los extractos de metanol mostraron una protección menor en comparación con extracto de acetato de etilo.</p>	(Vajravijayan et al., 2013)



<p>Extractos etanólicos obtenidos a partir de las raíces, hojas y corteza de <i>Jatrophaa ethiopica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cumarinas</li><li>- Saponinas</li><li>- Terpenos</li><li>- Esteroides.</li></ul>	<p>Los extractos etanólicos de las diferentes partes de la <i>J. aethiopica</i> muestran que los extractos de hojas y raíces produjeron una estabilización de la membrana eritrocitaria de un 62 y 65,3% respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ambos también significativamente superiores a la actividad del diclofenaco sódico. Los extractos de corteza, por su parte, no mostraron una actividad antiinflamatoria significativa (12 % de estabilización).</p>	<p>(Valdés-Izaguirre et al., 2018)</p>
<p>Preparación herbal (HP-4): combinación de 4 plantas medicinales <i>Aloe vera</i> 28.62%, <i>Bacopa monniera</i> 16.18% <i>Moringa oleífera</i> 14.90% <i>Zingiber officinale</i> 12.69%.</p>		<p>En el estudio de la actividad estabilizadora de membrana de HP-4 en un rango de concentración de 100-500 µg/ml protegieron significativamente la membrana de eritrocitos contra la lisis inducida por solución hipotónica, esta protección es dependiente de la concentración. El ácido acetilsalicílico en la concentración de 100-200 µg/ml utilizado como estándar también ofreció una protección significativa (<math>p &lt; 0,001</math>) de la membrana de los</p>	<p>(Padmanabhan &amp; Jangle, 2016)</p>



			eritrocitos contra el efecto dañino inducido por la solución hipotónica.	
	Extractos de las hojas y flores de <i>Echeveria peruviana</i> Meyen.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Terpenos</li><li>- Antocianidinas</li><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Esteroles</li></ul>	El porcentaje de protección de la membrana del eritrocito, efecto antiinflamatorio, por parte de los extractos de las hojas y flores de <i>Echeveria peruviana</i> Meyen., además de los controles (dexametasona 200ug/ml y diclofenaco 200ug/ml), se evidencia resultados favorables en todos los menstros obtenidos con diferentes solventes de polaridad creciente (etéreos, diclorometanos, clorofórmicos, etanólicos y acuosos) y a todas las concentraciones (400, 200, 100 y 50ug/ml). Estos valores van desde una media de $61.43 \pm 0.06$ para el extracto etanólico 96° de hojas a 50ug/ml hasta una media máxima de $97.33 \pm 0.03$ para el extracto diclorometano de flores a 400ug/ml, de ello también se aprecia que la actividad antiinflamatoria es dosis-dependiente, ya que a medida que la concentración de cada uno de los extractos	(Vera Abanto & Zavaleta Minchola, 2019)



			probados aumenta es mayor el porcentaje de protección de la membrana del eritrocito.	
	Extracto de hojas, flores y tallos de <i>Anredera vesicaria</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fenoles</li><li>- Flavonoides</li><li>- Cumarinas</li><li>- Alcaloides</li><li>- Triterpenos</li><li>- Mucílagos</li><li>- Saponinas</li></ul>	Se encontró que todos los extractos en diferentes concentraciones tienen la capacidad de estabilizar la membrana de los glóbulos rojos en solución hipotónica y para inhibir la hemólisis. Extractos acuosos de hojas y tallos mostró el mayor porcentaje de inhibición en 500µg/mL con 75.52% y 77.34%, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos. La actividad del extracto acuoso preparado de rizomas a 500 µg/mL fue significativamente menor. Sin embargo, todos los extractos acuosos exhibieron una actividad más alta que el diclofenaco estándar. Esta diferencia fue más pronunciada para el extracto de tallo en 125µg/mL. Se observó un efecto similar para los extractos etanólicos; todos ellos mostraron mayor actividad que el diclofenaco sódico estándar a 250 y 500µg/ml. A	(Morales et al., 2018)



			125µg/mL, solo el extracto de tallo exhibió una notable inhibición de la hemólisis de la membrana eritrocitaria. El máximo porcentaje de estabilización entre todos los extractos se observó en el extracto etéreo de tallo (82.03%) a 500µg/mL.	
	Extracto de <i>Elaeocarpus munronii</i>		El extracto etanólico de hojas de <i>E.munronii</i> produjo alrededor del 63,1% de estabilización de membrana a una concentración de 800 µg/ml comparado con el estándar que exhibió una estabilización del 72,3% a la misma concentración.	(Devir et al., 2019)
	Extracto de <i>Phyllanthus acidus</i> L.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Compuestos fenólicos</li></ul>	Los extractos exhibieron actividades antiinflamatorias y analgésicas significativas en forma dependiente de la dosis. El extracto de metanol a una dosis de 500 mg/kg mostró una actividad superior que era comparable con los fármacos estándar. El extracto de acetato de etilo mostró una actividad moderada, mientras que el extracto de éter de petróleo mostró la menor actividad.	(Chakraborty et al., 2012)



Extracto de <i>Centella asiatica</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Triterpenoides</li><li>- Polifenoles</li></ul>	El porcentaje de estabilización de la membrana para extractos metanólicos y diclofenaco sódico se realizó a 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg / ml. Los extractos metanólicos de <i>C. asiatica</i> son eficaces para inhibir la hemólisis inducida por calor de HRBC a diferentes concentraciones (50-2000 µg/ml). La inhibición máxima del 94,97% fue a 2000 µg/ml. Con el aumento de la concentración, la hemólisis de la membrana disminuye y la estabilización/protección de la membrana aumenta. Por tanto, la actividad antiinflamatoria de los extractos depende de la concentración.	(Chippada et al., 2011)
Extracto metanólico y acuoso de <i>Basella alba</i>	<p><b>Extracto metanólico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Saponinas.</li></ul> <p><b>Extracto acuoso:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Taninos</li><li>- Flavonoides</li></ul>	El extracto acuoso mostró una actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> significativa en comparación con el estándar. El extracto acuoso mostró una importante actividad antiinflamatoria (71,89%) a la dosis de 400 µg/ml. Sobre la base de los resultados	(Vijender Kumar et al., 2011)



		<ul style="list-style-type: none"><li>- Mucilagos</li><li>- Saponinas</li></ul>	anteriores se puede concluir que <i>Basella alba</i> L. tiene una actividad antiinflamatoria	
	Extracto de las hojas, tallo y flores de <i>Wedelia trilobata</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Terpenoides</li><li>- Saponinas</li></ul>	Todos los extractos inhibieron eficazmente la hemólisis inducida por calor. Estos resultados proporcionan evidencia de la estabilización de la membrana como un mecanismo adicional de su efecto antiinflamatorio. Este efecto puede posiblemente inhibir la liberación de contenido lisosómico de neutrófilos en el sitio de inflamación. Los extractos inhibieron la hemólisis inducida por calor de los glóbulos rojos en diversos grados. Las inhibiciones máximas son del 78,11% del extracto de hoja seguido del tallo (74,17%) y la flor (58,74%). El fármaco estándar de fármaco estándar de aspirina mostró una inhibición máxima del 85,92%.	(Govindappa et al., 2011)
	Extracto de <i>Severinia buxifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Alcaloides</li><li>- Terpenoides</li></ul>	El extracto metanólico mostró la mayor inhibición contra la hemólisis inducida por calor con IC50 de 319 µg/mL. Además, el extracto etanólico protegió eficazmente la	(Truong et al., 2019)



			membrana contra la hemólisis inducida por el calor. Sin embargo, se observó una baja actividad protectora en otros extractos. En comparación con los extractos de <i>S. buxifolia</i> , la aspirina mostró una protección del 29,26% a una concentración de 100 µg/mL.	
Extracto de <i>Enicostemma axillare</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Taninos</li><li>- Esteroides</li><li>- Fenoles</li></ul>		El extracto <i>Enicostemma axillare</i> (EAME) fue eficaz para inhibir la hemólisis inducida por calor a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que el EAME a concentraciones de 400 y 500 µg/ml protegen significativamente ( $p < 0.05$ ) la membrana de eritrocitos contra la lisis inducida por calor. La aspirina 100 µg/ml ofreció una protección significativa ( $p < 0,01$ ) contra el efecto dañino de la solución de calor.	(Leelaprakash & Mohan Dass, 2011)
Extracto de <i>Oryza sativa</i> Var. Arroz Joha	<ul style="list-style-type: none"><li>- Terpenoides</li><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Aceites volátiles.</li></ul>		La actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto de <i>Oryza sativa</i> Var. Arroz Joha a concentraciones de 100, 250 y 500 mcg/ml mostró una protección del 51,12; 58,75 y 63,77% de HRBC en solución hipotónica	(Rahman et al., 2015)



			respectivamente, mientras que el diclofenaco estándar a 50, 100 y 250 mcg/ml mostró 68.11; 73.83 y 76.17% de protección de HRBC en solución hipotónica respectivamente.	
	Extracto de <i>Thunnus alalunga</i>	- Esteroides	Los extractos glandulares de <i>Thunnus alalunga</i> a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 mg/mL) mostró una estabilización significativa hacia HRBC membranas. El porcentaje de protección a la concentración 300 mg/mL es más en comparación con las otras concentraciones. Sin embargo, a concentraciones más altas, el porcentaje de protección se encontró que estaba disminuido.	(Azeem et al., 2010)
	Extracto de <i>Cresecentia kujete</i>	- Compuestos fenólicos - Flavonoides	El extracto etanólico crudo (CEE) de hojas y corteza de <i>Cresecentia kujete</i> (concentración de 1.0 mg/ml) demostró fuerte actividad estabilizadora de la membrana (53,86 y 61,85% de protección, respectivamente), mientras que sus fracciones de cloroformo (CHF) revelaron actividad moderada (48,74 ±	(Parvin et al., 2015)



			0,56% y $43,55 \pm 6,20\%$ , respectivamente) en comparación con la aspirina estándar (concentración 0,10 mg/ml) que mostró una protección del 75,81% en esta prueba. Todas las muestras mostraron una actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis en la prueba de estabilización de la membrana de HRBC.	
	Extractos de: <i>Mesua nagassarium</i> <i>Kigelia Pinnata</i> .		Los extractos de <i>M. nagassarium</i> y <i>K. pinnata</i> , a una concentración de 2.0 mg/mL, protegieron significativamente la lisis de la membrana de eritrocitos inducida por solución hipotónica y calor en comparación con el estándar, ácido acetilsalicílico (0.10 mg/mL). La fracción soluble en éter de petróleo (PESF) de <i>M. nagassarium</i> y ácido acetilsalicílico (0,10 mg/ml) produjeron 49,19% y 73,19% de inhibición de la hemólisis de RBC causada por solución hipotónica, respectivamente. Los extractos solubles en cloroformo (CSF) y tetracloruro de carbono (CTCSF) también	(Rashid et al., 2011)



			revelaron una inhibición significativa de la hemólisis de RBC.	
	Extracto de fruta <i>Terminalia chebula</i>		El extracto de fruta de <i>T. chebula</i> demostró fuerte efecto estabilizador sobre la membrana de los glóbulos rojos. El efecto estabilizador fue dependiente de la concentración y varió desde 95,35% a 98,17%.	(Bag et al., 2013)
	Extracto del medicamento ayurvédico Tankan churna		Tankan churna mostró una actividad estabilizadora de membrana significativa del 72,22% a una concentración de 200 µg/ml.	(Kumar Ashok et al., 2011)
	Extracto de flores de <i>Couroupita guianensis</i>		Para el ensayo se utilizaron dos extractos, un metanólico y un etanólico de la flor de <i>Couroupita guianensis</i> . A la concentración de 500 mg/ml el extracto metanólico muestra una actividad antiinflamatoria significativa ( $70,58 \pm 7,1$ ) que es comparable al extracto de fármaco estándar ( $66,88 \pm 4,3\%$ ) y al extracto etanólico ( $67,90 \pm 5,8\%$ ). La actividad antiinflamatoria de los extractos dependía de la concentración, con el aumento de la concentración también aumenta la actividad.	(Sumathi & Anuradha, 2016)



	Extracto de flores de <i>Gliricidia sepium</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonoides</li><li>- Saponinas</li><li>- Triterpenoides,</li><li>Glucósidos</li><li>- Cumarina</li><li>- Ácido cumárico</li><li>- Ácido melilótico.</li></ul>	El extracto acuoso mostró actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis en el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500µg/ml) con un porcentaje de protección de 7.15, 11.25, 22.71, 24.83 y 26.95%, respectivamente, en comparación con el diclofenaco estándar 32.09% a 100 µg/ml.	(kola Kumar et al., 2014)
	Extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i>		El extracto metanólico de <i>Kalanchoe pinnata</i> presentan inhibición dependiente de la dosis. El porcentaje de inhibición fue similar al fármaco estándar utilizado, es decir, diclofenaco sódico. El valor CI <sub>50</sub> del extracto crudo era de 280 µg/mL mientras que el medicamento representaba más potencia con un valor de CI <sub>50</sub> de 250 µg/mL.	(Agarwal & Shanmugam, 2019)



	Aceites esenciales extraídos de: <i>Bunium incrassatum</i>  <i>Bunium alpinum</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Ácido palmítico</li><li>- Óxido de cariofileno</li><li>- n-Pentacosano</li> <li>- Óxido de cariofileno</li><li>- Epóxido de humuleno</li><li>- n-Pentacosano.</li></ul>	Los dos extractos de los aceites esenciales presentan actividad antiinflamatoria, y se observa que, entre todas las muestras, a la concentración de 800 µg/ml, mostraron una actividad antiinflamatoria significativa, de más del 70% de protección de HRBC. Los resultados se compararon con estándar (diclofenaco sódico) que mostró una protección de ≈ 88%.	(Hayet et al., 2017)
	Extractos de hojas de <i>Alternanthera sessilis</i> <i>Alternanthera philoxeroides</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Saponinas</li><li>- Terpenoides,</li><li>Flavonoides</li><li>- Taninos</li><li>- Esteroides</li><li>- Alcaloides.</li></ul>	Los extractos etanólicos de hojas de <i>A. sessilis</i> y <i>A. philoxeroides</i> fueron eficaces en la inhibición de la hemólisis inducida por calor de HRBC a diferentes concentraciones (100- 500 µg/ml). El aumento de la concentración, la hemólisis de la membrana disminuye y la estabilización/protección de la membrana aumenta. Por tanto, la actividad antiinflamatoria de los extractos depende de la concentración.	(Sunmathi et al., 2016).



	Extracto de hojas y corteza de <i>Syzygium cumini</i>	Taninos	Un componente bioactivo del extracto de hoja de <i>Syzygium cumini</i> a una concentración de 200-1000µg/ml protege la membrana de los glóbulos rojos humanos contra la lisis inducida por la solución hipotónica. A una concentración de 1000 µg/ml, los taninos el componente activo muestra una protección máxima del 82,94% en comparación con el diclofenaco sódico estándar que muestra 70,41% de protección a la misma concentración	(Patil et al., 2018)
--	-------------------------------------------------------	---------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

Elaborado por la autora.

**Tabla 4. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la desnaturalización de proteínas.**

<b>TÉCNICA APLICADA</b>	<b>PLANTAS MEDICINALES</b>	<b>METABOLITOS IDENTIFICADOS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
	Extracto de hojas y corteza de <i>Syzygium cumini</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcaloides</li> <li>- Taninos</li> <li>- Flavonoides</li> <li>- Fenoles.</li> </ul>	Entre los cuatro compuestos bioactivos, los taninos mostraron una inhibición máxima del 99,50% a la	(Patil et al., 2018)



Inhibición de la desnaturalización térmica de proteínas			concentración de 100 µg/ml en comparación con el fármaco antiinflamatorio estándar aspirina 89,26%	
	Extracto de <i>Tradescantia zembrina</i>	- Compuestos fenólicos	La infusión fue la que mejor efecto tuvo sobre la protección a la desnaturalización de proteínas que fue del 85%, mientras que las otras dos extracciones tuvieron 43-44% de actividad, en los tres casos fue mayor el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina.	(Sánchez Chino et al., 2019)
	Aislados proteicos de chía ( <i>Salvia hispánica L.</i> )		Se determinó la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los concentrados proteicos de chía obtenidos a diferentes pH, teniendo como resultado que a pH 6,0 a una concentración de 100µg/ml el porcentaje de inhibición fue mayor que los demás pH ensayados con un 335,41 %.	(Cárdenas Hidalgo, 2016)



	<i>Bacillo cereus</i> S1 marino	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cicloheptasiloxano</li><li>- Octadecametil-, heptasiloxano</li><li>- Ácido 1,2 bencenodicarboxílico,</li></ul>	La desnaturalización de las proteínas es una causa de inflamación bien documentada. Como parte de la investigación sobre el mecanismo de la capacidad de inflamación <i>in vitro</i> de los metabolitos producidos por <i>B. cereus</i> S1, se estudió la desnaturalización de proteínas. Mostró una actividad antiinflamatoria relativamente buena (86%) en comparación con el control sin adición del sobrenadante.	(Mostafa Hassan, 2016)
	Extractos de hojas y semillas de <i>Elaeocarpus serratus</i>		El porcentaje máximo de desnaturalización proteica se observó en el extracto de hoja (68,32%) seguido por el extracto de semilla (62,13%) a 400µg/ml. Los resultados fueron casi cercanos a la indometacina estándar que mostró un porcentaje de inhibición de 75,45% a 100µ/ml. Mientras que las dosis bajas (200	(Geetha et al., 2015)



			<p>µg/ml) de ambos extractos dieron un valor moderado (56,74% y 52,17% en hojas y semillas respectivamente). A partir de los resultados del presente estudio, se sabe que los extractos son capaces de controlar eficazmente la desnaturalización de proteínas en enfermedades inflamatorias.</p>	
	<p>Extracto de <i>Elaeocarpus munronii</i></p>		<p>En el presente estudio, el extracto de <i>E. munronii</i> en el rango de concentración de 50 a 800µg/ml proporcionó considerable protección contra la desnaturalización de la albúmina de huevo. Entre las diversas concentraciones probadas, el extracto de hoja etanólica evidenció 41,1% de actividad de desnaturalización de proteína a 800 µg/ml, mientras que el diclofenaco sódico provocó una supresión del 52,1% de</p>	<p>(Devir et al., 2019)</p>



			desnaturalización de proteínas a la misma concentración ensayada.	
	Preparación herbal: combinación de 4 plantas medicinales <i>Aloe vera</i> 28.62%, <i>Bacopa monniera</i> 16.18% <i>Moringa oleífera</i> 14.90% y <i>Zingiber officinale</i> 12.69%		HP-4 a concentraciones de (100-500 µg/ml) y ácido acetilsalicílico (100-200 µg/ml) mostraron una inhibición significativa de la desnaturalización del huevo albúmina de manera dependiente de la concentración.	(Padmanabhan & Jangle, 2016)
	Extracto de la raíz de <i>Curcuma zedoaria</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Saponinas</li><li>- Gomas</li><li>- Carbohidratos</li><li>- Azúcar reductor</li><li>- Alcaloides</li><li>- Esteroides</li><li>- Terpenoides.</li></ul>	El extracto etanólico de <i>C. zedoaria</i> mostró una inhibición media de la desnaturalización de proteínas de 77.15; 64.43; 53.04; 36.78 y 23.70% para dosis de 500, 400, 300, 200 y 100 µg/mL respectivamente, mientrasque, para ASA se encontró que era 88.06; 80.25; 77.18; 69.58 y 50.56% para las mismas dosis respectivamente. Los extractos etanólicos de <i>C. zedoaria</i> mostraron una buena actividad	(Ullah et al., 2014)



			antiinflamatoria con una respuesta lineal. La inhibición máxima de $77,15 \pm 2,93\%$ se observó a $500 \mu\text{g/mL}$ y el fármaco antiinflamatorio estándar (Aspirina) mostró la inhibición máxima, $88.06 \pm 2.07\%$ a la misma concentración	
	Extractos de hojas, tallos y flores de <i>Wedelia trilobata</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Terpenoides</li><li>- Saponinas</li></ul>	Se observó una inhibición máxima del $87,14\%$ en el extracto de hoja seguido del tallo ( $86,76\%$ ) y la flor ( $61,63\%$ ). La aspirina, un fármaco antiinflamatorio estándar, mostró una inhibición máxima del $76,69\%$ a la concentración de $200 \mu\text{g/ml}$ .	(Govindappa et al., 2011)
	Extracto de flores de <i>Moringa oleifera</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Esteroides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Alcaloides</li><li>- Terpenoides</li></ul>	El extracto de flor de <i>M. oleifera</i> ( $100-500 \mu\text{g/mL}$ ) mostró inhibición significativa sobre la desnaturalización de la albúmina de huevo en una forma dependiente de la dosis. La actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto fue comparable a la	(Alhakmani et al., 2013)



			<p>del diclofenaco sodio, un fármaco de referencia (100 y 200 µg/mL). Una diferencia significativa en la inhibición de la desnaturalización la proteína inducida térmicamente se observó en el caso del extracto en comparación con fármaco estándar a una concentración de 100 µg/mL. Aunque en concentración de 200 µg/mL, actividad inhibidora del extracto y el diclofenaco sódico fueron similares.</p>	
	<p>Extractos de semillas y frutos de <i>Zizyphus spinachrist</i></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Taninos</li><li>- Alcaloides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Glucósidos cardíacos</li></ul>	<p>Ambos extractos (100-500 µg/mL) mostraron inhibición significativa sobre la desnaturalización de la albúmina de huevo en una forma dependiente de la dosis. La actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los extractos fue comparada a la del diclofenaco de sodio, un fármaco de referencia a un nivel de dosis de 100 y</p>	<p>(Alhakmani et al., 2014)</p>



			200µg/mL. Una diferencia significativa en la inhibición de la desnaturalización de proteínas inducida térmicamente se observó en el caso del extracto de semillas en comparación con el extracto de fruta en concentraciones de 100 y 500 µg/mL.	
	Extracto de <i>Malvastrum Coromandelianum</i>	Flavonoides	El extracto de <i>M. coromandelianum</i> (50-100 µg/ml) mostró una inhibición significativa de la desnaturalización de la albúmina de huevo. El extracto de <i>M. coromandelianum</i> a una concentración de 100 µg/ml y diclofenaco a la misma concentración mostraron una inhibición significativa del 74,17% y 76,50% respectivamente.	(Yadav & Mohite, 2020)
	Extracto de <i>Severinia buxifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Flavonoides</li><li>- Alcaloides</li></ul>	Se observó actividad inhibidora contra la desnaturalización de la albúmina. en el extracto metanólico CI <sub>50</sub>	(Truong et al., 2019)



		- Terpenoides	28,86µg/mL, seguido de extracto etanólico y extracto de acetona con valores de CI <sub>50</sub> de 35 µg/mL y 91,6 µg/mL, respectivamente. Estos extractos mostraron una protección proteica significativamente mayor que la aspirina, un medicamento antiinflamatorio estándar, ya que la aspirina solo inhibe 33,61% de desnaturalización de albúmina a una concentración de 100 µg/mL. Sin embargo, los extractos de diclorometano, cloroformo y agua mostraron una baja capacidad para inhibir la desnaturalización de la albúmina. con valores de CI <sub>50</sub> de 592,00µg/mL, 623,08 µg/mL y 769,67 µg/mL, respectivamente	
	Extractos acuosos de té verde y hojas de té negro	Flavonoides	Al analizar la actividad antiinflamatoria de los extractos acuosos de té verde y hojas de té	(Chatterjee et al., 2012)



	<i>(Camellia sinensis)</i>		negro, en todo el rango de concentración de 31,25 a 1000 µg/ml, se concluye que la inhibición de la desnaturalización depende de la concentración de la proteína (albúmina). El diclofenaco sódico, en el rango de concentración de 78,125 a 2500 µg/ml, se utilizó como fármaco de referencia, también mostró que la inhibición de la desnaturalización de proteínas dependiente de la concentración. Se encontró que el extracto acuoso de té verde era más eficaz que extracto acuoso de té negro; sin embargo, se encontró que efecto del diclofenaco sódico era bastante bajo en comparación con los dos extractos de té de prueba.	
	Extracto de <i>Kalanchoe pinnata</i>		El extracto representó una inhibición de desnaturalización dependiente de la dosis de la albúmina de suero bovino.	(Agarwal & Shanmugam, 2019)



			Se determinó que el valor de $CI_{50}$ era $490 \mu\text{g/mL}$ . El valor de $CI_{50}$ obtenido para el fármaco estándar fue $250\mu\text{g/mL}$	
	Extracto de <i>Enicostemma axillare</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Taninos</li><li>- Esteroides</li><li>- Fenoles</li></ul>	El extracto fue eficaz para inhibir la desnaturalización de la albúmina inducida por el calor. Se observó una inhibición máxima del 71% a $500 \mu\text{g/ml}$ . La aspirina, un fármaco antiinflamatorio estándar, mostró una inhibición máxima del 68% a la concentración de $100 \mu\text{g/ml}$	(Leelaprakash & Mohan Dass, 2011)
	Extracto de <i>Oryza sativa</i> Var. Arroz Joha	<ul style="list-style-type: none"><li>- Terpenoides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Aceites volátiles.</li></ul>	Se analizó el extracto de <i>Oryza sativa</i> Var. Arroz Joha por el método de desnaturalización de la albúmina de huevo a concentraciones de 100, 250 y $500 \text{mcg/ml}$ , las cuales mostraron una inhibición del 75, 80.31 y 84.15% de la desnaturalización de la albúmina de huevo, mientras que el diclofenaco estándar a las mismas concentraciones	(Rahman et al., 2015)



			mostró 27.78; 45.84 y 69.77% de inhibición de la desnaturalización de albúmina de huevo.	
	Extractos de hojas de <i>Alternanthera sessilis</i> <i>Alternanthera philoxeroides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Saponinas</li> <li>- Terpenoide</li> <li>- Flavonoides</li> <li>- Taninos</li> <li>- Esteroides</li> <li>- Alcaloides</li> </ul>	La actividad antiartrítica /antiinflamatoria por el método de desnaturalización de albúmina de huevo a una concentración de 500 µg/ml, el extracto de <i>A.sessilis</i> mostró 84,34% y <i>A. philoxeroides</i> fue de 64,73%, mientras que el diclofenaco estándar fue de 97,51%.	(Sunmathi et al., 2016)
	Ácido glicirrónico extraído del regaliz de <i>Glycyrrhiza glabra</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavonoides</li> <li>- Saponinas</li> <li>- Triterpinoides</li> </ul>	El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la absorbancia y se encontró que el extracto y el estándar (ácido salicílico) mostraban 27,11% y 49,15% de inhibición respectivamente.	(Chauhan et al., 2018)
	Aceites esenciales extraídos de: <i>Bunium incrassatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido palmítico</li> <li>- Óxido de cariofileno</li> <li>- n-pentacosano</li> <li>- Óxido de cariofileno</li> <li>- Epóxido de humuleno</li> </ul>	Los extractos de los aceites esenciales presentan inhibición significativa de la desnaturalización de proteínas, los valores de inhibición fueron 49,74 ±	(Hayet et al., 2017)



	<i>Bunium alpinum</i>	- n-pentacosano.	0,90% para <i>B. incrassatum</i> y para <i>B. alpinum</i> 49,98 ± 0,45%	
--	-----------------------	------------------	-------------------------------------------------------------------------	--

Elaborado por la autora

**Tabla 5. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la COX.**

<b>TÉCNICA APLICADA</b>	<b>PLANTAS MEDICINALES</b>	<b>METABOLITOS IDENTIFICADOS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
Inhibición de la COX-2	Extractos de rizomas de: <i>Curcuma xanthorrhiza</i> <i>Curcuma domestica</i>	Curcumoides	Se evaluó la actividad antiinflamatoria de <i>C. xanthorrhiza</i> y <i>C. domestica</i> a través de los porcentajes de inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX2). Valores de porcentaje de inhibición de la actividad inhibidora de COX <sub>2</sub> de <i>C. domestica</i> y <i>C. xanthorrhiza</i> fueron 74.84 y 67.96%. El extracto de <i>C. domestica</i> presentó el valor más alto de inhibición. Los compuestos de curcuminoides son los principales compuestos de <i>C. xanthorrhiza</i> y <i>C. domestica</i> con propiedades antiinflamatorias.	(Nurcholis et al., 2012)



kit de ensayo de detección de inhibidores colorimétricos de COX (ovino humano)	Extractos de: <i>Cissus quadrangularis</i> , <i>Plumbago zeylanica</i> , <i>Terminalia bellarica</i> <i>Terminalia chebula</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Flavonoides</li></ul>	Los resultados obtenidos revelan que se encontró que la mayoría de las plantas inhiben la actividad de COX-2 en comparación con COX-1. Se observaron que los extractos de <i>T. bellarica</i> (73,34%) y <i>T. chebula</i> (74,81%) mostraron inhibición significativa selectiva para COX-2 en comparación con otras muestras.	(Shaikh et al., 2016)
	Extracto de frutas de <i>Calophyllum Inophyllum</i>	Cumarinas isopreniladas	Los ensayos <i>in vitro</i> demostraron que el extracto crudo en concentración de 50 µg/ml inhibieron el 77% de la actividad de la ciclooxigenasa lo que indica su potencial como agente antiinflamatorio.	(Zakaria et al., 2014)
Inhibición de la COX-1	Extractos de: <i>Veronica jacquinii</i>  <i>Veronica urticifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cumarinas</li><li>- Baicalina</li><li>- Apigenina</li><li>- Rutina</li><li>- Lignina.</li></ul>	El potencial antiinflamatorio de los extractos probados se determinó utilizando ionóforo de calcio para estimular plaquetas humanas como fuente de enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y 12-lipoxigenasa (12-LOX). El extracto de <i>V. urticifolia</i> ejerció la inhibición más fuerte de COX-1 (CI <sub>50</sub> <0.4 mg / mL), mientras que el extracto de <i>V. jacquinii</i>	(Beara et al., 2015)



			exhibió la mayor capacidad para inhibir la actividad de 12-LOX (CI <sub>50</sub> = 1,072 mg / ml).	
Inhibición de la COX-1 y COX-2	Extracto de <i>Bursera copallifera</i>	Triterpenos	La evaluación de la inhibición de las enzimas COX-1,y COX-2 mostraron que ninguno de los triterpenos naturales inhibió la COX-1 cuando se evaluó a 70 μM, y solo los compuestos 2 y 3 inhibieron la actividad de COX-2 a 70 μM en 62,85% y 73,28 % respectivamente.	(Romero-Estrada et al., 2016)
Inhibición de la COX-1 y COX-2	Diez compuestos de antra-, nueve nafto- y cinco benzoquinonas de origen natural y cinco naftoquinonas sintéticas.		Las naftoquinonas probadas y benzoquinonas eran en general potentes inhibidores de COX en contraste con las antraquinonas que no mostraron prácticamente actividad inhibidora.	(Landa et al., 2012)
Inhibición de la COX-1 y COX-2	Extracto de <i>Curcuma longa</i> y sus análogos.	Curcumina	La actividad inhibidora de los compuestos 1, 2 y 3 para COX-1 y COX-2. Las actividades oscilan entre 68,4% y 77,8% para COX-1 y 59,3% -81,9% para COX-2. El compuesto 2 muestra la mayor actividad inhibidora para ambas proteínas. Los compuestos 2 y 3 son	(Yuniarti et al., 2012)



			más selectivos hacia la COX-2, mientras que el compuesto 1 es más selectivo hacia la COX-1.	
--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------	--

Elaborado por la autora

**Tabla 6. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la lipoxigenasa.**

<b>TÉCNICA APLICADA</b>	<b>PLANTAS MEDICINALES</b>	<b>METABOLITOS IDENTIFICADOS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
Inhibición de la 5-lipoxigenasa.	Extracto de las partes aéreas de <i>Verbascum eskisehirensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Luteolina</li> <li>- Otros tipos de flavonoides y sus derivados</li> </ul>	El extracto a una concentración de 100 µg/ml mostró una débil actividad antiinflamatoria (17,9 ± 1,3% de inhibición de la 5-lipoxigenasa (5-LOX) mientras que el control positivo, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) mostró una fuerte actividad antiinflamatoria. El valor CI50 de NDGA se calculó como 5,9 ± 0,3 µg/ml. Desafortunadamente, el valor de CI50 del extracto no se calculó debido a la baja actividad.	(Ozturk et al., 2019)



Inhibición de la lipoxigenasa	Extracto acuoso de <i>Enicostemma axillare</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alcaloides</li><li>- Flavonoides</li><li>- Taninos</li><li>- Esteroides</li><li>- Fenoles</li></ul>	El extracto acuoso de <i>Enicostemma axillare</i> (EAME) a diferentes concentraciones a 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml, mostró 09, 17, 26, 48, 62% de inhibición de anti-lipoxigenasa respectivamente. A partir de estos resultados, se obtuvo la inhibición más fuerte a una concentración de 500 µg/ml. La indometacina estándar mostró una inhibición del 86% a una concentración de 100 µg/ml. A la concentración de 100 y 200 µg/ml, EAME no mostró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en comparación con el control.	(Leelaprakash & Mohan Dass, 2011)
Inhibición de la lipoxigenasa	Extracto de frutas de <i>Calophyllum Inophyllum</i>	Cumarinas isopreniladas	Los ensayos <i>in vitro</i> demostraron que el extracto crudo a una concentración de 50 ug/ml inhibió el 88% de la actividad lipooxigenasa, lo que indica su potencial como agente antiinflamatorio.	(Zakaria et al., 2014)
Inhibición de la 12-LOX	Extractos de: <i>Veronica jacquinii</i> Baumg.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cumarinas</li><li>- Baicalina</li><li>- Apigenina</li></ul>	El extracto de <i>V. jacquinii</i> exhibió lamayor capacidad para inhibir la actividad de 12-LOX (CI50 = 1,072 mg/ ml). Los resultados	(Beara et al., 2015)



	<i>Veronica teucrium</i> L. <i>Veronica urticifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Rutina</li><li>- Lignina.</li></ul>	obtenidos en este estudio pueden utilizarse para promover un mejor uso del género <i>Veronica</i> como agentes antiinflamatorios.	
Inhibición de la lipoxigenasa	Extractos de vino tinto y blanco	Compuestos fenólicos	Las fracciones de contenido total fenólico y orto-fenólico, parecen no presentar actividad antirradical ni antiinflamatoria. La estructura molecular de cada fenólico, independientemente de la clase fenólica a la que pertenece, parece contribuir a la actividad de estos compuestos.	(Xanthopoulou et al., 2010)
Inhibición de la lipoxigenasa	Extractos de: <i>Xanthium strumarium</i> , <i>Achyranthes aspera</i> <i>Duchesnea indica</i>		Entre los extractos crudos analizados, <i>Duchesnea indica</i> mostró la mayor inhibición (73%), en comparación con el estándar baicaleína (83%). Con respecto a las diferentes fracciones, la fracción de acetato de etilo de todas las plantas analizadas mostró la mayor inhibición de la lipoxigenasa (63, 70 y 75% para <i>Xanthium strumarium</i> , <i>Achyranthes aspera</i> y <i>Duchesnea indica</i> , respectivamente) en comparación con el estándar. La fracción de	(Khuda et al., 2014)



			n-butanol de <i>Xanthium strumarium</i> también mostró una actividad significativa (61%).	
Inhibición de la lipoxigenasa	Extractos de lactonas triterpénicas obtenidas de <i>Lactuca sativa</i>	Lactonas triterpénicas	Se aislaron dos lactonas triterpénicas obtenidas de <i>Lactuca sativa</i> . Ambas mostraron una actividad inhibidora prometedora contra la lipoxigenasa. Valores de CI50 de 3,14. La primera lactona es 3,14-dihidroxi-11,13-dihidrocostunolida y la segunda es 8-tigloil-15-desoxilactucina, sus porcentajes de inhibición fueron $59 \pm 0,21\%$ y $14 \pm 0,19\%$ respectivamente. El valor de CI50 del compuesto estándar baicaleina fue $22,1 \pm 0,03\mu\text{M}$ .	(Araruna & Caros, 2010)

Elaborado por la autora

**Tabla 8. Aplicaciones de la técnica de la inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos**



TÉCNICA APLICADA	PLANTAS MEDICINALES	METABOLITOS IDENTIFICADOS	RESULTADOS	REFERENCIAS
Inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos	Extractos de: <i>Angelica sylvestris</i> (AS) <i>Anacyclus pyrethru</i> (AP) <i>Artemisia vulgaris</i> (AV), <i>Picrorrhiza kurroa</i> (PK) <i>Terminalia chebula</i> (TC)		Todos los extractos etanólicos mostraron inhibición de la producción de NO a una concentración de 100 µg/ml (AP, AS, AV, PK y TC son 49.55; 90.01; 88.71; 73.75 y 90.73 µg/ml respectivamente), solo dos extractos como AV y TG no presentaron citotoxicidad frente a Células RAW 256,7 y puede inhibir la producción de óxido de NO más del 50%. Fueron diluidos y evaluados por inhibición de la producción de óxido nítrico y encontraron que las CI50 (n = 3) de AV y TG fueron $28.09 \pm 7.02$ y $41.94 \pm 9.43$ µg/ml respectivamente. Se concluye que AV mostró el mejor efecto inhibidor sobre la producción de NO.	(Kittisrisopit et al., 2010)
	Extracto de frijoles rojos y blancos ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Compuestos fenólicos.	El tratamiento con LPS indujo una alta producción de NO dependiente de la dosis. El pretratamiento con extractos de leguminosas redujo la producción de NO	(García-Lafuente et al., 2014)



			inducida por todas las concentraciones de LPS, y esta reducción fue más evidente cuando las células se estimularon con el menor nivel de LPS (10 ng/ml). Además, el extracto de frijoles morados redondos siempre exhibió un mayor efecto que el extracto de frijoles blancos	
	Extractos de: <i>Artemisia stolonifera</i> (AST), <i>Artemisia selengensis</i> (ASE), <i>Artemisia Capillaris</i> (ACA), <i>Artemisia sylvatica</i> (ASY), <i>Artemisia keiskeana</i> (AKE) <i>Artemisia Scoparia</i> (ASC).		Los extractos de Artemisia se investigaron en base a la producción de NO por los macrófagos RAW 264,7 estimulados con lipopolisacáridos. El LPS estimuló la producción de NO por 32,8 veces en comparación con el nivel basal. Aunque se probaron varias concentraciones de extracto (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL), casi ninguno de los extractos mostró un efecto inhibitor sobre la producción de NO en concentraciones más bajas (<100 mg / mL). En particular, AKE bajó la actividad de NO en 14% y 33% a 100 y 200 mg/mL,	(Choi et al., 2013)



			respectivamente, en comparación con el control.	
	Extracto N-butanolico de <i>Ipomoea stolonifera</i>		El extracto de <i>Ipomoea stolonifera</i> redujo la producción de NO, PGE2, TNF-a, IL-1b e IL-6 en células RAW264.7 activadas con LPS <i>in vitro</i> . Estos resultados sugieren que <i>I. stolonifera</i> posee una considerable actividad antiinflamatoria, y puede convertirse en una fuente potencial de agentes antiinflamatorios naturales	(Cai et al., 2014)
	Ginseng ( <i>Panax ginseng</i> )	Triterpenos	Los resultados muestran que los epímeros 20S (compuestos 2 y 3) y los epímeros 20R (compuestos 9 y 10) inhibieron significativamente la sobreproducción del mediador inflamatorio NO. Sin embargo, los epímeros 20S (compuestos 2 y 3) y los epímeros 20R (compuestos 9 y 10) no mostraron una inhibición obvia sobre la sobreproducción de otro importante mediador inflamatorio PGE2, excepto que solo 20 (S) -PPD inhibió débilmente la	(Zhang et al., 2019)



			sobreproducción de PGE2. Estos resultados indicaron que el mecanismo antiinflamatorio de tales triterpenos no es a través de la ruta de prostaglandinas (PG) mediada por ciclooxigenasa.	
	17-O-acetilacuminolida (AA)(diterpenoide aislado de la especie vegetal <i>Neouvaria foetida</i> )	17-O-acetilacuminolida	La liberación de NO fue inhibida eficazmente por AA con una CI50 de 0,62ug/ml. Después de 20 horas de tratamiento y estimulación, AA causó una inhibición del 78,9% de NO a 1,25 ug/ml, sin afectar la viabilidad celular	(Achoui et al., 2010)
	Extracto de raíz de jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	Triterpenoides	Cuatro compuestos pudieron inhibir la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS de una manera dependiente de la dosis. El [6] - Shogaol y [6] -dehydroshogaol exhibieron niveles extremadamente altos de efecto inhibitorio de NO con CI50 de $5,80 \pm 1,27 \mu\text{M}$ y $7,50 \pm 0,44 \mu\text{M}$ , respectivamente, mientras que 1-deshidro- [6] -gingerdiona mostró un alto efecto inhibitorio con un valor de IC50 de	(Li et al., 2011)



			25,06 ± 4,86 μM. La actividad antiinflamatoria más baja se observó en extractos de hexahidrocurcumina (CI50 = 304,76 ± 54,80 μM),	
	Extractos metanólicos de diferentes especies de hongos comestibles: <i>Garicus bisporu</i> , <i>Boletus edulis</i> <i>Cantherellus cibarius</i> <i>Cratarellus cornucopioides</i> <i>Lactarius deliciosus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> .	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Ergosterol</li><li>- Terpenoides.</li></ul>	Los extractos metanólicos de <i>A. bisporus</i> , <i>C. cibarius</i> , <i>C. cornucopioides</i> y <i>L. deliciosus</i> mostraron una inhibición de la producción de NO mientras que los extractos de <i>B. edulis</i> y <i>P. ostreatus</i> no mostraron ningún efecto.	(Moro et al., 2012)
	Extracto de hojas de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Quercetina</li><li>- Kaempferol</li><li>- Ácido clorogénico</li></ul>	Hubo una amplia variación entre las accesiones de <i>H. sabdariffa</i> , con un rango desde una inhibición mínima del 9,1% de inhibición hasta el 57,9% inhibición a 80 ug/ml. La respuesta promedio fue 26,4% ±	(Zhen et al., 2016)



			11,4% inhibición a una concentración de 80 ug/ml.	
	Extracto del hongo ostra ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )		El tratamiento con concentrado de hongo ostra (OMC) suprimió significativamente la producción de TNF-a, IL-6 e IL-12 dependiente de LPS, respectivamente, de una manera dosis-respuesta.  se observó la única inhibición leve de la proliferación celular (viabilidad) después de 48 y 72 horas a la concentración más alta (100 µg/ml) de tratamiento con OMC. Por lo tanto, el OMC inhibió la expresión de TNF-a, IL-6 e IL-12 en 62%, 93% y 64%, respectivamente, a 100 µg/ml	(Jedinak et al., 2011)
	Extracto de alga parda comestible <i>Saccharina japonica</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Porfirina</li><li>- Feofitina</li><li>- Feoforbida</li><li>- Fucoxantina.</li></ul>	La fracción de acetato de etilo demostró la mayor inhibición de la producción de NO inducida por LPS (IC50 = 25,32 ug/mL), seguida de la fracción CH2Cl2 (CI50 = 75,86 µg/ml).	(Islam et al., 2013)



	<p>Extractos de hongos comestibles  <i>Agaricus bisporus</i>  <i>Boletus edulis</i>  <i>Cantharellus cibarius</i>  <i>Caripia montagnei</i>  <i>Cratarellus cornucopoides</i>  <i>Flammulina velutipes</i>  <i>Inonotus obliquus</i>  <i>Lactarius deliciosus</i>  <i>Lentinus edodes</i>  <i>Pleurotus ostreatus</i>  <i>Pleurotus tuber-regium</i>  <i>Tricholoma matsutake</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácidos p-hidroxibenzoico.</li> <li>- p-cumárico</li> <li>- cinámico</li> </ul>	<p>Los extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Macrolepiota procera</i>, <i>Boletus impolitus</i> y <i>Agaricus bisporus</i> revelaron el potencial antiinflamatorio más fuerte (valores de CE<sub>50</sub> 96 ± 1 a 190 ± 6 µg/mL), y también la concentración más alta de ácido cinámico (656 a 156 µg/g), que también fue el compuesto individual con la mayor actividad. Antiinflamatorio. Los derivados del ácido p-cumárico revelaron las propiedades más fuertes, especialmente el derivado metilado en el grupo carboxílico (CoA-M1) que exhibió una actividad similar a la mostrada por la dexametasona utilizada como estándar antiinflamatorio; Por el contrario, los derivados de p-hidroxibenzoico revelaron la inhibición más baja</p>	<p>(Taofiq et al., 2015)</p>
	<p>Extracto de alga  <i>Eisenia bicyclis</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Florotaninos</li> <li>- Diterpenos</li> <li>- Polisacáridos</li> <li>- Fitoesteroles</li> </ul>	<p>El extracto de MeOH y sus fracciones CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y EtOAc, así como sus constituyentes fucosterol y florotaninos,</p>	<p>(Jung et al., 2013)</p>



		- Fitopigmentos.	contenidos en <i>E. bicyclis</i> poseen una actividad antiinflamatoria suficiente para inhibir la producción de NO inducida por LPS, los niveles de proteína de iNOS y generación de ROS inducida por COX-2. Por lo tanto, estos componentes, ya sea por separado o en combinación, puede funcionar como potentes agentes antiinflamatorios.	
	Aislados de proteína de frijol negro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )		Dependiendo de los días de germinación, los efectos inhibidores sobre la síntesis de NO en macrófagos estimulados con LPS fueron mejorado como indicador de su potencial antiinflamatorio. Los aislados de proteína de los cotiledones de frijol negro germinados un día mostraron un potencial inhibitorio similar al de las muestras crudas. Sin embargo, cuando fueron digeridos durante 120 o 180 min, la actividad inhibidora aumentó al 55% o 73%, valores superiores a los observado en muestras crudas (23% o 34%). Informes anteriores sobre frijol negro	(López-Barrios et al., 2016)



			<p>crudo demostraron que se requirió más de 80 min de digestión enzimática para observar una inhibición significativa de la síntesis NO. Cuando los frijoles negros eran germinados durante 2 días, la actividad inhibitoria fue incluso menor que el observado para las muestras crudas, situándose en 19% y 56%, respectivamente. Esta baja actividad inhibitoria aumentó después de 60 min de digestión. A pesar de esto, después de 120 min de digestión con pepsina-pancreatina, todas las muestras germinadas tuvieron una mayor actividad inhibitoria de la síntesis de NO que muestras crudas. La inhibición máxima de la síntesis de NO observada en este experimento (90%) correspondió al hidrolizado de 60 min de aislado de proteína de frijol negro germinado durante 3 días. Curiosamente este hidrolizado tenía una mayor concentración de aminoácidos libres en comparación con</p>	
--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--



			las otras muestras en el mismo tiempo de digestión.	
	Glucósidos de luteolina aislados de limoncillo <i>Cymbopogon citratus</i> (DC)	Luteolina y sus glucósidos	En condiciones de reposo, los macrófagos RAW 264.7 produjeron bajos niveles de nitritos ( $0.11 \pm 0.06$ ), que aumentó después de la activación celular con LPS durante 24 h. La aglicona de luteolina suprimió fuertemente la producción de nitrito con niveles similares al control. En contraste, isoorientina, casiaoccidentalina B y orientina, todos glucósidos C de luteolina, no mostraron efecto significativo en la producción de nitrito. Por otro lado, en la concentración más alta, 100 M, la luteolina 7-O- $\beta$ -glucopiranosido (L7OG) inhibió significativamente la producción de NO inducida por LPS en un $44 \pm 8\%$ (en relación con LPS), lo que indica que L7OG tiene propiedades antiinflamatorias.	(Francisco et al., 2014)
	Extracto de <i>Dilodendron bipinnatum</i>	Taninos	La concentración basal de nitrito en células RAW 264,7 no estimuladas fue $0,1 \pm 0,23$	(de Oliveira et al., 2014)



			<p>μM. El grupo que fue estimulado con LPS 0.5 μg/mL o coestimulado con LPS 0.5 μg/mL e IFN-γ 0,5 ng/mL presentaron incrementos del 95,7% y 94,9% (p&lt;0,001) respectivamente, en la concentración de nitrito, en comparación con el grupo falso. El pretratamiento con el extracto de <i>Dilodendron bipinnatum</i> (1, 5 y 20 μg/mL) no alteró (p&lt;0.05) niveles de nitrito en el sobrenadante celular estimulado por LPS o LPS con IFN-γ</p>	
	Extracto etanólico del cáliz de <i>Panax ginseng</i>		<p>El extracto etanólico del cáliz de <i>Panax ginseng</i> (Pg-C-EE) suprime la producción de NO en células RAW264.7 estimuladas con LPS, esta inhibición es dependiente de la dosis. Los niveles supresores de Pg-C-EE en la producción de NO mostraron 11% (100 μg/mL), 28% (100 μg/mL) y 64% (400 μg/mL).</p> <p>Pg-C-EE también inhibió la producción de NO en macrófagos peritoneales tratados con</p>	(Han et al., 2018)



			LPS. El nivel supresor de Pg-C-EE en la producción de NO fue del 59,1% a 400 µg/ml, mientras que el del fármaco estándar (1,5 mM) fue del 86,7%	
	Extracto de la fruta <i>Punica granatum</i> Linne	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fenoles</li><li>- Flavonoles</li></ul>	EL N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) actuó como un control positivo y mostró una inhibición significativa de la actividad de iNOS a 400 µM. Sin embargo, estos cuatro taninos hidrolizables no tenían actividad iNOS. Incluso exhibió citotoxicidad a 100 µM. Por lo tanto, estos cuatro taninos hidrolizables inhibieron la producción de NO.	(C.-J. Lee et al., 2010)
	Extracto de <i>Ocimum labiatum</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Diterpenoide</li><li>- Flavonoides</li></ul>	Las células de control no estimuladas, después de 24 h de incubación, produjeron una cantidad insignificante de NO (<10 µM). La producción de NO en células estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) fue evidente (43 µM), mientras que no se detectaron niveles significativos de NO en las células tratadas con extracto. Las tres	(Kapewangolo et al., 2015)



			concentraciones probadas para el compuesto diterpenoide ( $p < 0.05$ ) disminuyó significativamente el nivel de NO en las células con 25 $\mu\text{M}$ del compuesto siendo más significativo al reducir la producción de NO a un nivel indetectable.	
	Flavonoides totales de semillas de <i>Camellia oleifera</i>	Flavonoides	El tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) (100 ng/ml) aumentó la cantidad de NO en células RAW264,7. Los flavonoides totales inhibieron significativamente la producción de NO de una manera dependiente de la concentración ( $P < 0,05$ ). La producción de NO con el tratamiento de la muestra (50-200 mg/ml) osciló entre 65,85% y 8,54% en comparación con el control grupo. El valor $CI_{50}$ de la muestra analizada para la producción de NO se estimó en 87 $\mu\text{g/ml}$	(Liu et al., 2014)
	Extracto de hojas de <i>Dendropanax morbifera</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Quercetina</li><li>- Catequina</li><li>- Miricetina</li><li>- Ácido p-cumárico,</li><li>Naringenina</li><li>- Vainillina</li></ul>	Los extractos metanólicos de dos etapas diferentes de hojas de <i>D. morbifera</i> (hojas verdes y senescentes) exhibió un fuerte efecto supresor sobre la producción de	(Hyun et al., 2015)



		<ul style="list-style-type: none"><li>- Ácido gálico</li><li>- Resveratrol</li></ul>	mediadores proinflamatorios inducidos por LPS y citocinas mediante la supresión de la expresión de la proteína iNOS y COX-2.	
	Extracto del alga <i>P. tenera</i> (PTP), <i>S. cristaefolium</i> (SCP), and <i>M. nitidum</i> (MNP)		Tanto SCP como MNP tenían un potente efecto inhibitor de óxido en células RAW264.7 inducidas por LPS, por ejemplo, los niveles de secreción de óxido en las células RAW264.7 fueron de 0,78 $\mu$ M en un control negativo y 9,53 $\mu$ M en células inducidas por LPS. Los niveles de secreción de NO fueron 3,11 $\mu$ M (67,4% de inhibición) y 2,47 $\mu$ M (74,1% de inhibición) en células RAW264.7 inducidas por LPS tratadas con 400 $\mu$ g/ml de MNP o SCP, respectivamente. Por lo tanto, SCP tenía una actividad inhibitora de NO más alta que la de MNP.	(Wu et al., 2016)
	17 compuestos químicos puros	<ul style="list-style-type: none"><li>- Hidrato de catequina, calicosina</li><li>- Ácido cafeico</li><li>- Curcumina</li><li>- Eugenol</li><li>- Ácido ferúlico</li></ul>	Se evaluó los efectos de 17 compuestos sobre la secreción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Las células se pretrataron con 17 compuestos a concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu$ g/ml antes de	(K. J. Lee et al., 2015)



		<ul style="list-style-type: none"><li>- Hidrato de ácido gálico, Hiperósido, Kaempferol,</li><li>- Magnolol,</li><li>- Quercetina</li><li>- Quercetina glucósido</li><li>- Quercitrina hidrato</li><li>- Hidrato de rutina</li><li>- Ácido sinapico</li><li>- Vainillilacetona</li><li>- Ácido ascórbico.</li></ul>	la estimulación con LPS y también se midió la producción de NO. Se empleó dexametasona 10 µM como control positivo. La vanililacetona, el hidrato de ácido gálico, el kaempferol, la quercetina, el magnolol y la curcumina exhiben un fuerte efecto inhibitor sobre la secreción de NO tras la estimulación con LPS.	
	Extracto de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	Isotiocianatos	Los compuestos 5 y 8, probados a 1 y 5 µM, mostraron una reducción significativa de la expresión de iNOS e IL-1β. Estas concentraciones fueron mucho más bajas que concentraciones efectivas reportadas para polifenoles, como quercetina (100 µM), requeridas para inhibir la expresión del gen iNOS en un diseño experimental similar. Además, el concentrado de moringa a 100 µg/mL y el compuesto 5 a 5 µM pudieron disminuir la expresión del gen de IL-6 de forma significativa.	(Waterman et al., 2014)



	Extracto de arándano coreano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> )	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fenoles</li><li>- Flavonoides</li></ul>	Para investigar la viabilidad celular de los extractos de arándanos, se incubaron células RAW 264.7 con 5 y 50 µl/ml durante 24 h. Los extractos de arándanos protegieron las células RAW 264.7 de la apoptosis inducida por LPS. El 99% de las células fueron viables después de la estimulación con LPS durante 24 h. Sin embargo, después del tratamiento con arándanos la viabilidad de las células RAW aumentó aproximadamente un 100% con el tratamiento de 50 µg/ml de ambos extractos de arándano.	(Samad et al., 2014)
	Derivados del ginseng rojo coreano		El preparado de una fracción enriquecida en ginsenósido (AP-SF) condujo a una supresión significativa de la producción de NO en comparación con una fracción de saponina de ginseng coreano convencional, inducida por lipopolisacárido y zimósán A. Curiosamente, AP-SF redujo fuertemente los niveles de ARNm de genes para la NO sintasa inducible, factor de necrosistumoral-	(Baek et al., 2016)



			a, y ciclooxigenasa sin afectar la viabilidad celular.	
	Extracto de <i>Bursera copallifera</i>	Triterpenos	La $\alpha$ -amirina y el 3-epilupeol fueron los mejores inhibidores de la producción de NO en células RAW 264,7 activado por LPS con valores de IC50 de 15,5 y 8,98 $\mu$ M respectivamente, y no afectó su viabilidad.	(Romero-Estrada et al., 2016)
	Extracto etanólico de <i>Euphorbia hirta</i>		La actividad antiinflamatoria fue mayor en presencia de 200 $\mu$ g/mL de extracto de <i>E. hirta</i> , y la producción de óxido nítrico disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ).	(Sharma et al., 2014)
	Extracto de <i>Tanacetum vulgare</i>		El extracto de <i>Tanacetum vulgare</i> presenta actividad inhibitoria significativa en la producción de NO por macrófagos, estimulados con LPS. La actividad antiinflamatoria del aceite esencial parece impulsada principalmente por el $\alpha$ -humuleno	(Coté et al., 2017)
	Fermentado de la raíz de <i>Atractylodis Macrocephalae</i>		Dos preparaciones fermentadas de raíz de <i>Atractylodis Macrocephalae</i> , denominadas FRAM-1 (preparadas en caldo Luria-Bertani) y FRAM-2 (preparadas en glucosa)-	(Bose & Kim, 2013)



			<p>Ambas formulaciones fermentadas exhibieron actividades antiinflamatorias apreciables en términos de su capacidad para inhibir las reacciones inducidas por LPS, expresión génica y producción inducida de varios mediadores inflamatorios clave y citocinas en macrófagos RAW 264.7. Sin embargo, en la mayoría de los casos, FRAM-2 exhibió efectos antiinflamatorios más fuertes que FRAM-1. Los hallazgos sugieren que la supresión de la actividad del factor nuclear-<math>\kappa</math>B (NF-<math>\kappa</math>B) podría ser uno de los posibles mecanismos por los cuales la RAM fermentada ejerce sus efectos antiinflamatorios.</p>	
	<p>Fracción flavonoide de las hojas de <i>Abutilon theophrasti</i></p>	<p>Flavonoides</p>	<p>Se analizó el extracto de flavonoides totales (TFE), según los resultados, las concentraciones de COX-2 y NO aumentaron muy significativamente (<math>p \leq 0.01</math>) en el grupo LPS en comparación con el grupo de control. Los niveles de expresión de</p>	<p>(Tian et al., 2018)</p>



			<p>los genes COX-2 e iNOS disminuyeron significativamente (<math>p \leq 0.01</math>) de una manera dependiente de la concentración en el grupo tratado con 50, 100 y 200 <math>\mu\text{g/ml}</math> de TFE en comparación con el grupo tratado con LPS. Estos estudios indicaron que TFE tiene un efecto inhibitorio directo sobre la producción de COX-2 y NO y bloquea su expresión génica en RAW inducido por LPS 264,7.</p>	
	<p>Polisacáridos de <i>Zizyphus jujube</i></p>		<p>La liberación de NO se midió en las células RAW264.7 expuestas al extracto de <i>Zizyphus jujube cv. Muzao</i> (ZMP) o LPS. Ninguna producción fue notablemente mayor en las células RAW264.7 tratadas con LPS que en las células de control. El pretratamiento con ZMP disminuyó significativamente la producción de NO de forma dosis-dependiente. ZMP podría inhibir la expresión de ARNm de enzimas involucrados en la producción de NO</p>	<p>(Ji et al., 2017)</p>



	Extracto de <i>Sorbaria kirilowii</i>		El extracto etanolico de <i>Sorbariakirilowii</i> (Sk-EE) redujo significativamente la producción de NO en macrófagos inducidos e inhibió la expresión de citocinas relacionadas con la inflamación y activación de factores de transcripción. Además, el tratamiento con Sk-EE también disminuyó la activación de proteínas implicadas en la cascada de señalización del factor nuclear (NF) $\kappa$ B.	(Jang et al., 2020)
	Extracto de flores de Chuju ( <i>Chrysanthemum morifolium</i> )	Flavonoides	Un estudio químico de un extracto de las flores condujo al aislamiento de 16 flavonoides, los cuales se caracterizaron como quercetina (1), isoramnetina 3-O-b-D-glucosido (2), eriodictiol (3), piracantosido (4), apigenina (5), apigetrina (6), acacetina (7), acacipetalina (8), luteolina (9), diosmetina (10), espinacetina (11), axilarina (12), bonanzina (13), cirsilol (14), crisosplenol D (15) and artemetina (16).	(Hu et al., 2017)



			<p>La mayoría de los flavonoides aislados de Chuju poseían una considerable actividad inhibidora de la producción de NO. En comparación con el ibuprofeno de control positivo (<math>IC_{50} = 30,57 \mu M</math>), nueve compuestos (1, 5, 7, 9-11, 13, 14 y 16) mostraron actividades más fuertes, 15 mostraró una actividad moderada y 3, 4 y 12 estaban inactivos.</p> <p>Más de la mitad de los flavonoides obtenidos de Chuju mostraron una mayor inhibición de la producción de NO que el control positivo (ibuprofeno, <math>IC_{50} = 30,57 \mu M</math>). La comparación de los valores de <math>CI_{50}</math> entre luteolina (<math>15.59 \mu M</math>) con quercetina (<math>30.01 \mu M</math>) reveló que las flavonas tenían una actividad más fuerte que los flavonoles correspondientes.</p>	
	Extractos de hojas de: <i>Citonia aromatisans</i>		Los extractos de <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i> disminuyeron la producción de NO inducida por lipopolisacárido (LPS) de	(Villa-De La Torre et al., 2017)



	<i>Montanoa grandiflora</i>		manera dependiente de la concentración sin afectar la viabilidad celular.	
	Extracto de <i>Cryptostegia grandiflora</i>		Las fracciones de éter y diclorometano de <i>Cryptostegia grandiflora</i> disminuyeron la producción de NO de manera dependiente de la concentración, reduciendo significativamente la concentración de nitrito en el medio de cultivo en comparación con el grupo solo tratado con LPS	(Castro et al., 2014)

Elaborado por la autora

**Tabla 8. Aplicaciones de otras técnicas “in vitro” para valorar actividad antiinflamatoria.**

<b>TÉCNICA APLICADA</b>	<b>PLANTAS MEDICINALES</b>	<b>METABOLITOS IDENTIFICADOS</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>REFERENCIAS</b>
Inhibición de la Xantina Oxidasa	Polifenoles de orujos de uva <i>Tannat</i> uruguayos y extractos de propóleos.	Cianidin-3-O- (6- (E) -p-cumaroil	Los compuestos extraídos presentan actividad inhibidora de XO y, a su vez, podría causar la disminución de la cantidad de radicales libres y los depósitos	(Alvareda et al., 2019)



			de ácido úrico. De hecho, los eventos mediados por polifenoles puede provocar una disminución en la evolución de la enfermedad de la gota, así como la reducción del daño tisular que suele observarse en otras patologías asociadas con un aumento en la generación de ROS.	
Técnica espectrofotométrica de la elastasa pancreática porcina	Extracto de <i>Thitonia tubaeformis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fenoles o taninos hidrosolubles</li><li>- Taninos tipo catecoles</li><li>- Alcaloides</li><li>- Esteroides</li><li>- Cumarinas</li></ul>	Todas las muestras presentaron actividad antiinflamatoria. Hasta el momento no existen reportes sobre la actividad antiinflamatoria en <i>Tithonia tubaeformis</i> , sin embargo, sobre especies de la familia a la que pertenece, que es la Asteraceae, se ha reportado que es fuente de lactonas sesquiterpénicas con bioactividad enzimática inhibitoria a la elastasa, en las especies de <i>Sigesbekia orientalis</i> y <i>Mikania cordata</i> . Por otra parte, <i>Sylibum maritimum</i> , también perteneciente a la misma familia, contiene una mezcla de flavonoides bioactivos que son los	(Dávalos et al., 2013)



			responsables de la inhibición de esta enzima.	
Inhibición de respuestas celulares innatas en monocitos humanos.	Extractos acuoso y metanólico de <i>Berberis darwinii</i>	Alcaloides berberinico	Los resultados indican que estos extractos inhiben la producción de anión superóxido, la expresión del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y de interleucina-1beta, (IL-1 $\beta$ ) en monocitos activados con lipopolisacárido. Estos resultados sugieren la existencia de compuestos con potencial acción antiinflamatoria en esta planta.	(Alarcón et al., 2014)
Actividad antiinflamatorio en neutrófilos aislados	Extracto hidroalcohólico de flores y hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Compuestos fenólicos</li><li>- Taninos</li><li>- Terpenos</li><li>- Flavonoides.</li></ul>	El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i> presentó un valor de porcentaje de inhibición inflamatoria de 97,18% $\pm$ 1,85, en tanto que el extracto obtenido a partir de flores de <i>Oreocallis grandiflora</i> un valor de 68,27% $\pm$ 2,88 y la referencia (ácido acetilsalicílico) 74,11% $\pm$ 0,11 resultados obtenidos a partir de tres réplicas del experimento a la	(Yanza Moreno, 2017)



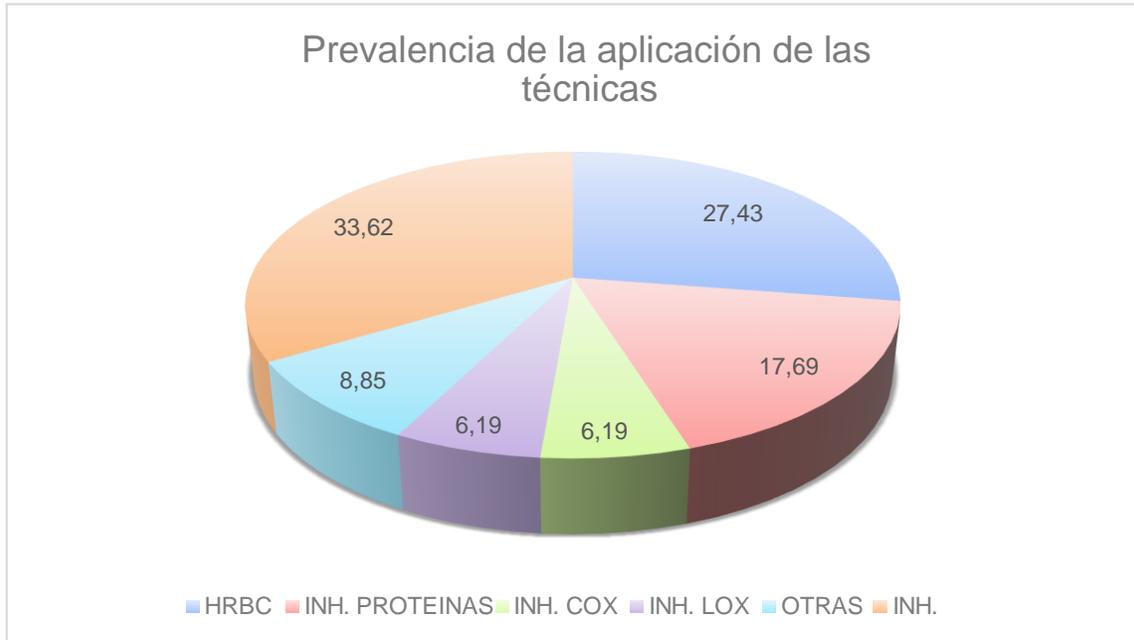
			concentración de 200 ppm de extracto hidroalcohólico o referencia.	
Inhibición de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$	Siete variedades comerciales de avena sin cascara	Avenantramida	La variedad de avena Dancer inhibió la activación del factor de necrosis tumoral $\alpha$ inducida por el factor nuclear kappa B en un 27,5% en 2 mg/ml, mientras que la variedad Deiter mostró una inhibición del 13,7% a una dosis comparable	(Chu et al., 2013)
Inhibición de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$	Producto natural plumericina (extracto de <i>Himatanthus sukuuba</i> )	Plumericina	La plumericina abolió efectivamente la activación de NF- $\kappa$ B en un modelo de célula informadora de luciferasa, inhibió la expresión inducida por TNF- $\alpha$ de las moléculas de adhesión proinflamatorias VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en células endoteliales	(Fakhrudin et al., 2014)
Expresión de ICAM-1 en células endoteliales estimuladas con TNF- $\alpha$	Extracto de <i>Verbascum phlomoides</i> .	Polifenoles Ácidos polifenolcarboxílicos como el ferúlico, cafeico y rosmarínico	Dependiendo de la concentración, el extracto ejerció actividad depuradora del radical DPPH (EC50 7.09 mg / mL), inhibió significativamente el TNF- $\alpha$ inductor de la expresión de ICAM-1 enun	(Grigore et al., 2013)



			55-58,8% en células endoteliales de vena umbilical humana a 100 y 200 mg/ml.	
Inhibición de la hialuronidasa	Extracto de <i>Pleurotus tuberregium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcaloides</li> <li>- Taninos</li> </ul>	La actividad de inhibición de hialuronidasa del extracto acuoso (3,94% y 22,19% de inhibición a concentraciones de 50 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente) es significativa (p <0,001) superior al extracto metanólico de <i>P. tuber-regium</i> .	(Dandapat & Sinha, 2015)
Inhibición de la fosfolipasa A2	Extracto de <i>Bursera copallifera</i>	Triterpenos	La evaluación de la inhibición de PLA2 mostró que todos los compuestos inhibían moderadamente esta enzima. El compuesto 2 (17.27%), 3 (12,6%), 4 (7,12%), 5 (16,6%) y 6 (9,31%) a 70 µM	(Romero-Estrada et al., 2016)
Ensayo en macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 y estimulados con lipopolisacárido	Extractos de chaya ( <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavonoides</li> <li>- Flavanonas</li> <li>- Dihidroflavonoles</li> </ul>	El extracto etanólico tuvo la mayor actividad antiinflamatoria al reducir la expresión génica de TNF-a en un 39,78 % y la de IL-6 en un 97,81 %, y su producción en un 46 % y un 48,38 %, respectivamente.	(Us-Medina et al., 2020)

Elaborado por la autora

## PREVALENCIA DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS.



*Figura 1. Prevalencia de la aplicación de las técnicas antiinflamatorias in vitro.* Se presentan las técnicas de mayor a menor prevalencia. **INH. NO:** Inhibición del Óxido nítrico, **HRBC:** Estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos, **INH PROTEINAS:** Inhibición de la desnaturalización de proteínas, **OTRAS,** **INH. COX:** inhibición de la ciclooxigenasa, y **INH. LOX:** inhibición de la lipoxigenasa

## CONCLUSIONES

Los estudios que evalúan la actividad antiinflamatoria en extractos vegetales, animales y en compuestos naturales o sintéticos pueden desarrollarse en modelos farmacológicos *in vitro*. De estos modelos, los que más se han repetido en los artículos encontrados con mayor frecuencia son: Inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS), estabilidad de la membrana eritrocitaria e inhibición de la desnaturalización de proteínas (albúmina). La alta prevalencia de la aplicación de estas técnicas se debe a que son fácilmente reproducibles, los reactivos están disponibles y no son costosos en relación a las técnicas “*in vivo*” además los procedimientos llevan un tiempo relativamente corto. Sin embargo, el ensayo de estabilidad de la membrana eritrocitaria y el de inhibición de la desnaturalización de las proteínas, son métodos que evalúan la actividad antiinflamatoria de manera indirecta, pues no inhiben las enzimas que participan en el proceso inflamatorio. El ensayo de estabilidad de la membrana eritrocitaria permite evaluar la hemólisis inducida por calor o solución hipotónica y el porcentaje de protección hacia la membrana, en los estudios realizados el cien por ciento de estabilidad de la membrana dependió de la concentración de los extractos vegetales, a mayor concentración mayor protección y por ende menor porcentaje de hemólisis. De igual manera en el ensayo de inhibición de la desnaturalización de las proteínas, la concentración de los extractos vegetales o animales juega un rol importante; a mayor concentración las proteínas están más protegidas de sufrir desnaturalización por calor. Además, la técnica de la inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS), es específica y sensible, y permite no solo cuantificar el NO producido sino también otros mediadores químicos como el TNF- $\alpha$  y la PGE.

Por otra parte, la variedad de artículos revisados demuestra que existe una amplia gama de plantas medicinales que han sido utilizadas por sus propiedades antiinflamatoria sobre todo la cultura hindú y la cultura oriental, por lo que se consideran puntos de partida para la búsqueda de nuevas moléculas como blancos para constituirse como fármacos siguiendo los pasos posteriores de investigación. Es así que, de la totalidad de estudios revisados, solo un extracto de vino tinto y blanco no presentaron actividad antiinflamatoria, así mismo existieron extractos vegetales que presentaron similar porcentaje de actividad



antiinflamatoria que el fármaco estándar utilizado, por ejemplo se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de *Croton lechleri* que se conoce comúnmente como sangre de drago, mediante el ensayo de estabilización de membrana eritrocitaria (HRBC), cuyos resultados fueron, el porcentaje de protección de  $43,2 \pm 0,9\%$ ; a la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ , en comparación con la dexametasona, que presentó una actividad antiinflamatoria del  $42,8 \pm 1,4\%$  a la concentración misma concentración.

Asimismo, existieron extractos vegetales cuya actividad antiinflamatoria evaluada mediante la misma técnica mencionada anteriormente, superó la actividad antiinflamatoria del fármaco estándar, por ejemplo, el extracto de *Pelargonium hispidum* a una concentración de 625  $\mu\text{g/ml}$  mostró el  $99,99 \pm 0,22\%$  de protección, en comparación con el diclofenaco a la misma concentración que presentó el  $98,71 \pm 0,31\%$  de protección. Por lo tanto, es importante conocer el porcentaje de actividad antiinflamatoria que presenta el extracto vegetal o animal, para realizar futuras investigaciones *in vivo*, y comprobar dicha actividad.

Finalmente, esta revisión queda a disposición de todo investigador como una guía para el descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural con potencial antiinflamatorio y que presente reacciones adversas mínimas y el investigador es libre de elegir cualquier técnica de acuerdo a sus necesidades.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar otra ecuación de búsqueda para encontrar otras técnicas que valoren la actividad antiinflamatoria *in vitro*.
- Investigar si los extractos analizados *in vitro* también tienen estudios *in vivo* para establecer su potencial farmacológico.
- Investigar o analizar a los extractos vegetales o animales, en los cuales no hubo un análisis fitoquímico para determinar su composición y determina el o los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria.



## BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Achoui, M., Appleton, D., Abdulla, M. A., Awang, K., Mohd, M. A., & Mustafa, M. R. (2010). In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Activity of 17-O-Acetylacuminolide through the Inhibition of Cytokines, NF- $\kappa$ B Translocation and IKK $\beta$  Activity. *PLOS ONE*, 5(12), e15105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015105>
- Acostupa, F. de M., Chávez, A., Mejía, S., Pauta, M., & Tucunango, J. (2017). Efecto antiinflamatorio in vitro de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2, 79-85.
- Afsar, V., Mohan Reddy, Y., & Saritha, K. (2012). *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research: In vitro antioxidant activity and antiinflammatory activity of methanolic leaf extract of Boswellia Serrata*. 1(4). <http://www.ijlbpr.com/uploadfile/2015/0414/20150414033742942.pdf>
- Agarwal, H., & Shanmugam, V. K. (2019). Anti-inflammatory activity screening of Kalanchoe pinnata methanol extract and its validation using a computational simulation approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, 14, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2019.01.002>
- Alarcón, D., Ramos, M., González, D., Díaz, R., & Núñez, D. (2014). Los extractos acuoso y metanólico de Berberis darwinni H (Berberidaceae) inhiben respuestas celulares innatas en monocitos humanos tratados in vitro. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.*, 13(1), 81-91.
- Alhakmani, F., Khan, S. A., & Ahmad, A. (2014). Determination of total phenol, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of Zizyphus spina-christi grown in Oman. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S656-S660. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0273>
- Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), 623-627. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)
- Alvareda, E., Iribarne, F., Espinosa, V., Miranda, P., Santi, D., Aguilera, S., Bustos, S., & Zunini, M. P. (2019). Journal of Biophysical Chemistry. In Silico and in Vitro Approach for the Understanding of the Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Uruguayan Tannat Grape Pomace and Propolis Poliphenols. *Journal of Biophysical Chemistry*, 10(01), 1. <https://doi.org/10.4236/jbpc.2019.101001>



- Araruna, K., & Carlos, B. (2010). Anti-inflammatory activities of triterpene lactones from *Lactuca sativa*. *Phytopharmacology*, *1*, 1-6.
- Azeem, A. K., Dilip, C., Prasanth, S., Shahima, V. J. H., Sajeev, K., & Naseera, C. (2010). Anti-inflammatory activity of the glandular extracts of *Thunus alungu*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *3*(10), 794-796. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60190-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60190-3)
- Baek, K.-S., Yi, Y.-S., Son, Y.-J., Yoo, S., Sung, N. Y., Kim, Y., Hong, S., Aravinthan, A., Kim, J.-H., & Cho, J. Y. (2016). In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of Korean Red Ginseng-derived components. *Journal of Ginseng Research*, *40*(4), 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.003>
- Bag, A., Bhattacharyya, S. K., Pal, N. K., & Chattopadhyay, R. R. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharmaceutical Biology*, *51*(12), 1515-1520. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.799709>
- Batlouni, M. (2010). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia: Antiinflamatorios no esteroides: Efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales*. *94*, 556-563.
- Beara, I., Živković, J., Lesjak, M., Ristić, J., Šavikin, K., Maksimović, Z., & Janković, T. (2015). Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three *Veronica* species. *Industrial Crops and Products*, *63*, 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.034>
- Bordés González, R., Martínez Beltrán, M., García Olivares, E., & Guisado Barrilao, R. (2014). *El proceso inflamatorio*. <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/266>
- Borrás-Verdera, A., Calcedo-Bernal, V., Ojeda-Levenfeld, J., & Clavel-Sainz, C. (2012). Eficacia y seguridad de una única inyección intraarticular de ácido hialurónico al 2% más manitol en artrosis de rodilla durante un periodo de 6 meses. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, *56*(4), 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.recot.2012.02.004>
- Bose, S., & Kim, H. (2013, marzo 14). *Evaluation of In Vitro Anti-Inflammatory Activities and Protective Effect of Fermented Preparations of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae on Intestinal Barrier Function against Lipopolysaccharide Insult* [Research Article]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2013/363076>
- Cai, C., Chen, Y., Zhong, S., Ji, B., Wang, J., Bai, X., & Shi, G. (2014). Anti-Inflammatory Activity of N-Butanol Extract from *Ipomoea stolonifera* In Vivo and In Vitro. *PLOS ONE*, *9*(4), e95931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095931>
- Camps, D. (2010). *Bioquímica del estrés Oxidativo*. Lulu.com.



- Cano, L. E., Gómez, L. M., Aristizábal, B., & Lopera, D. (2015). Inflamación. En W. Rojas, *Inmunología de Rojas*. CIB.
- Cárdenas Hidalgo, M. K. (2016). "Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) y evaluación in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante". [Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica]. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/23819>
- Cárdenas, P., Aragón, D., Ospina, L., Isaza, G., & Pérez, J. (2012). Efecto de algunas especies vegetales antiinflamatorias sobre la actividad enzimática de elastasa y mieloperoxidasa. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/download/45094/46446>
- Carrillo Terán, W. I., & Cárdenas Hidalgo, M. K. (2016). Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) y evaluación in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante. [Pregrado, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.]. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/23819>
- Castro, J. P., Ocampo, Y. C., & Franco, L. A. (2014). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Cryptostegia grandiflora* Roxb. Ex R. Br. Leaves. *Biological Research*, 47, 1-8. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-32>
- Cayman Chemical. (2017). *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit*.
- Chakraborty, R., Biplab, D., Devanna, N., & Sen, S. (2012). Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Phyllanthus acidus* L. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2, Supplement), S953-S961. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60343-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60343-8)
- Chatterjee, P., Chandra, S., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(2), 136-138. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.97298>
- Chauhan, S., Gulati, N., Nagaich, U., Chauhan, S., Gulati, N., & Nagaich, U. (2018). Ácido glicirrónico: Extracción, cribado y evaluación de la propiedad anti-inflamatoria. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 59(2), 61-67. <https://doi.org/10.30827/ars.v59i2.7513>
- Chippada, C., Volluri, S., Bammidi, S., & Vangalapati, M. (2011). IN VITRO ANTI INFLAMMATORY ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACT OF CENTELLA ASIATICA BY HRBC MEMBRANE STABILISATION . *Rasayan Journal*, 4(2), 457-460.



- Choi, E., Park, H., Lee, J., & Kim, G. (2013). Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of *Artemisia* species in vitro. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(1), 92-97. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(13\)60107-7](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(13)60107-7)
- Chu, Y.-F., Wise, M. L., Gulvady, A. A., Chang, T., Kendra, D. F., Jan-Willem van Klinken, B., Shi, Y., & O'Shea, M. (2013). In vitro antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of seven common oats. *Food Chemistry*, 139(1), 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.104>
- Corte Sánchez, D., Yáñez Ocampo, B. R., Esquivel Chirino, C. A., Corte Sánchez, D., Yáñez Ocampo, B. R., & Esquivel Chirino, C. A. (2017). Uso de ácido hialurónico como alternativa para la reconstrucción de la papila interdental. *Revista odontológica mexicana*, 21(3), 205-213.
- Coté, H., Boucher, M.-A., Pichette, A., & Legault, J. (2017). Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines*, 4(2), 34. <https://doi.org/10.3390/medicines4020034>
- Dandapat, S., & Sinha, M. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Pleurotus tuber-regium* (Rumph. Ex Fr.) Singer. *Advances in Biological Research*, 9(3), 140-145. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.3.93117>
- Dávalos, J. H., Lomelí, M. G., López, F. S., Sahagún, A. R., Río, J. A. M. D., Medina, P. J. G., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). SCREENING FITOQUÍMICO Y CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE HOJAS DE *Tithonia tubaeformis*. *Biotecnia*, 15(2), 53-60. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i2.150>
- de Oliveira, R. G., Mahon, C. P. A. N., Ascêncio, P. G. M., Ascêncio, S. D., Balogun, S. O., & Martins, D. T. de O. (2014). Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 387-395. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.041>
- Devir, A., Arumugam, S., & Thenmozhi, K. (2019). IN VITRO ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-ARTHRITIC ACTIVITY OF ETHANOLIC LEAF EXTRACT OF *ELEAEOCARPUS MUNRONII* (WT.) MAST. (ELAEOCARPEACEAE). *International Journal of Scientific Research and Review*.
- Duarte, J., Espinosa, R., Díaz, S., Sánchez, G., Lee Eng, E., Mijangos, J., & Barragán, J. (2008). *Óxido nítrico: Metabolismo e implicaciones clínicas*. [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)
- Durán Lengua, M., Gaitán Ibarra, R., & Cano Durán, L. (2014). Efectos de extractos de *Neopetrosia rosariensis* sobre mieloperoxidasa y elastasa con la utilización del modelo neutrófilos. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(1), 146-155.



- Echeverría, N., & Mockus, I. (2008). FACTOR NUCLEAR  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B): SIGNALOSOMA Y SU IMPORTANCIA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y CÁNCER. *Revista Farmacia Medica*, 56(2), 133-146.
- Escárcega, R. (2010). El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48(1), 55-60.
- Fakhrudin, N., Waltenberger, B., Cabaravdic, M., Atanasov, A. G., Malainer, C., Schachner, D., Heiss, E. H., Liu, R., Noha, S. M., Grzywacz, A. M., MihalyBison, J., Awad, E. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Rollinger, J. M., Bochkov, V., Stuppner, H., & Dirsch, V. M. (2014). Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 171(7), 1676-1686. <https://doi.org/10.1111/bph.12558>
- Fernández, V. L. (2019). *Efecto del ácido hialurónico intraarticular en la sinovitis experimental* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidade de Santiago de Compostela]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=242874>
- Francisco, V., Figueirinha, A., Costa, G., Liberal, J., Lopes, M. C., García-Rodríguez, C., Geraldes, C. F. G. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2014). Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass. *Journal of Functional Foods*, 10, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.003>
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M., & Mateo-Vivaracho, L. (2014). In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.004>
- Geetha, H., Jayashree, I., & Rajeswari, M. (2015). IN VITRO ANTI-ARTHRITIC ACTIVITY OF ELAEOCARPUS SERRATUS LINN. (ELAEOCARPACEAE) | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 6(6). <https://ijpsr.com/bft-article/in-vitro-anti-arthritic-activity-of-elaecarpus-serratus-linn-elaecarpaceae/?view=fulltext>
- Gómez Ordóñez, S., Gutiérrez Áñvarez, Á. M., & Valenzuela Plata, E. L. (2007, septiembre). *Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente*.
- Govindappa, M., Naga Sravya, S., Poojashri, M., Sadananda, T., & Chandrappa, C. (2011). Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3(3), 43-51.



- Grigore, A., Colceru-Mihul, S., Litescu, S., Panteli, M., & Rasit, I. (2013). Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein). *Pharmaceutical Biology*, *51*(7), 925-929. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.767361>
- Gutiérrez, I., & Mamani, L. (2011). *Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa de los Extraectos secos etanólicos al 70% de plantas usada tradicionalmente para el tratamiento de gota y determinación de metabolitos secundarios* [Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco]. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/1056>
- Han, S. Y., Kim, J., Kim, E., Kim, S. H., Seo, D. B., Kim, J.-H., Shin, S. S., & Cho, J. Y. (2018). AKT-targeted anti-inflammatory activity of *Panax ginseng* calyx ethanolic extract. *Journal of Ginseng Research*, *42*(4), 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.06.003>
- Hayet, E. K., Hocine, L., & Meriem, E. K. (2017). CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS AND THE METHANOLIC EXTRACTS OF *BUNIMUM INCRASSATUM* AND *BUNIMUM ALPINUM* FROM ALGERIA. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *62*(1), 3335-3341. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072017000100006>
- Hu, J., Ma, W., Li, N., Wang, K.-J., Hu, J., Ma, W., Li, N., & Wang, K.-J. (2017). Antioxidant and Anti-Inflammatory Flavonoids from the Flowers of Chuju, a Medical Cultivar of *Chrysanthemum Morifolim* Ramat. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *61*(4), 282-289.
- Hyun, T. K., Ko, Y.-J., Kim, E.-H., Chung, I.-M., & Kim, J.-S. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Industrial Crops and Products*, *74*, 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.002>
- Iancu, C., Cioanca, O., Gaidon, C., Mircea, C., Munteanu, A., Filip, N., Hanganu, B., Manoilescu, I., & Hancianu, M. (2017). *Farmacia. Cytoprotective and antiinflammatory activity evaluation of some Pelargonium extracts*. *65*(6), 891-895.
- Islam, M. N., Ishita, I. J., Jin, S. E., Choi, R. J., Lee, C. M., Kim, Y. S., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.054>
- Jang, J., Lee, J. S., Jang, Y.-J., Choung, E. S., Li, W. Y., Lee, S. W., Kim, E., Kim, J.-H., & Cho, J. Y. (2020). *Sorbaria kirilowii* Ethanol Extract Exerts Anti-Inflammatory Effects In Vitro and In Vivo by Targeting Src/Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B. *Biomolecules*, *10*(5), 741. <https://doi.org/10.3390/biom10050741>



- Jedinak, A., Dudhgaonkar, S., Wu, Q., Simon, J., & Sliva, D. (2011). Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling. *Nutrition Journal*, 10(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-52>
- Ji, X., Peng, Q., Li, H., Liu, F., & Wang, M. (2017). Chemical Characterization and Anti-inflammatory Activity of Polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. Muzao. *International Journal of Food Engineering*, 13(7). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0382>
- Jung, H. A., Jin, S. E., Ahn, B. R., Lee, C. M., & Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.061>
- Kapewangolo, P., Omolo, J. J., Bruwer, R., Fonteh, P., & Meyer, D. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. *Journal of Inflammation*, 12(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0049-4>
- Khaund, P., Joshi, S. R., Khaund, P., & Joshi, S. R. (2016). Lentinula edodes based GIS mapping, biometabolites and antiinflammatory activity of wild edible mushrooms from tropical «sacred grove» forests of Meghalaya, India. *Revista de Biología Tropical*, 64(1), 247-257. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i1.20349>
- Khuda, F., Iqbal, Z., Khan, A., Zakiullah, A., Shah, Y., Ahmad, L., Nasir, F., Hassan, M., Ismail, Q., & Shah Ali, W. (2014). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(2), 365-368.
- Kittirisopit, S., Parnthong, S., & Itharat, A. (2010). Antiinflammatory and antimicrobial activities of Thai plant extracts for hemorrhoid treatment. *Thai Jorunal Pharmacol*, 32(1), 119-121.
- Kumar, kola, Naik, V., Chandra, B., Lavanya, R., Kumar, N., Bhagyasree, V., & Sudeepthi, L. (2014). Evaluation of In vitro and In vivo Anti-Inflammatory Activity of Aqueous Extract of *Gliricidia sepium* Flowers in Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(3), 477-481.
- Kumar Ashok, B. S. A., Saran, G. S., Mouna, A., & Kumar, C. N. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of Tankana churna. *Food and Feed Research*, Volume 40, Issue 1 (Volume 40, Issue 1), 17-20-17-20.
- Kumar, Vijender, Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). *IN-VITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF LEAF EXTRACTS OF BASELLA ALBA LINN. VAR. ALBA*. 5.



- Kumar, Vinay, Abbas, A., Fausto, N., & Michell, R. (2008). *Patología humana* (8.<sup>a</sup> ed.). Elsevier. [https://books.google.com/books/about/Patolog%C3%ADa\\_humana.html?hl=es&id=cFRHkIp7dggC](https://books.google.com/books/about/Patolog%C3%ADa_humana.html?hl=es&id=cFRHkIp7dggC)
- Landa, P., Kutil, Z., Temml, V., Vuorinen, A., Malik, J., Dvorakova, M., Marsik, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Schuster, D., & Vanek, T. (2012). Redox and Non-Redox Mechanism of In Vitro Cyclooxygenase Inhibition by Natural Quinones. *Planta Medica*, 78(04), 326-333. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280430>
- Latorre, M., Núñez, J., Sanchis, J., Bodí, V., & Chorro, F. (2008). *Publicación Oficial de la Sociedad Valenciana de Cardiología: Alopurinol como Inhibidor de la Xantina-Oxisada en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. Un viejo conocido como próximo escalon terapéutico?* 12(1). [www.svcardio.org](http://www.svcardio.org)
- Lee, C.-J., Chen, L.-G., Liang, W.-L., & Wang, C.-C. (2010). Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 118(2), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.123>
- Lee, K. J., Oh, Y. C., & Ma, J. Y. (2015). *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay*. <https://doi.org/10.1155/2015/165457>
- Leelaprakash, G., & Mohan Dass, S. (2011). INVITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT OF ENICOSTEMMA AXILLARE. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(3), 189-196.
- León, M., Borges, A., Armas, J., Miranda, L., Varens, J., & Cuesta del Sol, J. (2015, marzo). *Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. I*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2221-24342015000100006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342015000100006)
- Li, F., Wang, Y., Parkin, K. L., Nitteranon, V., Liang, J., Yang, W., Li, Y., Zhang, G., & Hu, Q. (2011). Isolation of quinone reductase (QR) inducing agents from ginger rhizome and their in vitro anti-inflammatory activity. *Food Research International*, 44(6), 1597-1603. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.010>
- Liu, X., Jia, L., Gao, Y., Li, B., & Tu, Y. (2014). Anti-inflammatory activity of total flavonoids from seeds of Camellia oleifera Abel. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(10), 920-922. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu071>
- López-Barrios, L., Antunes-Ricardo, M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016). Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, 203, 417-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.048>



- Macías Abraham, C. (2006). Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(2), 0-0.
- Macías, C., Villaescusa, R., del Valle, L., Boffil, V., Cordero, G., Hernández, A., Hernández, P., & Ballester, J. M. (2003). Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo. *Revista Española de Cardiología*, 56(2), 137-144. <https://doi.org/10.1157/13043219>
- Morales, J., Santisteban, A., Fuentes, D., Guardia, Y., & Torres, E. (2018). In vitro anti-inflammatory activity of aqueous, ethanolic and ethereal extracts of rhizomes, leaves and stems of *Anredera vesicaria*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, Volume 7(Issue 4). <https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00266>
- Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., Martínez, J. A., & García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130(2), 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.049>
- Mostafa Hassan, S. W. (2016). *Antibacterial, Anticoagulant and Anti-inflammatory Activities of Marine Bacillus cereus SI. 10(4)*, 2593-2606.
- Noa Puig, M., Más Ferreiro, R., Mendoza Castaño, S., & Valle Clara, M. (2011). Fisiopatología, tratamiento y modelos experimentales de artritis reumatoide. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 297-308.
- Nurcholis, W., Ambarsari, L., Kartika, N. L. P., & Darusman, L. (2012). *Actas del Seminario Nacional de Química en Unesa. Curcuminoid Contents, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Curcuma xanthorrhiza RoxB. and Curcuma domestica Val. Promising Lines From Sukabumi of Indonesia*. 284-292.
- Ocampo, J., Gaviria, R., & Sánchez, J. (2017). Prevalencia del asma en América Latina. Mirada crítica a partir del ISAAC y otros estudios. *Revista Alergia México*, 64, 188. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i2.256>
- Ozturk, G., Agalar, H., Yildiz, G., Goger, F., & Kirimer, N. (2019). Biological activities and luteolin derivatives of *Verbascum eskisehirensis* Karavel., Ocak & Ekici. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(3), 532-542.
- Padmanabhan, P., & Jangle, S. (2016). EVALUATION OF IN-VITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF HERBAL PREPARATION, A COMBINATION OF FOUR MEDICINAL PLANTS. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 109-116.



- Parvin, Mst. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, Most. A., Nahar, L., & Islam, Md. E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*, 8(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1384-5>
- Patil, P., Magar, K., Bansode, T., Gupta, A., Chaphalkar, S., Patil, A., & Sherkhane, A. (2018). *Exploring Anti-Inflammatory Potential in Leaves of Jamun (Syzygium Cumini)*. 5(2),90-96.
- Pérez Betancourt, Y., & Moya Castillo, E. V. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro de los extractos vegetales de Marco (Ambrosia arboresces) y Quishuar (Buddleja incana), obtenidos mediante secado por aspersión* [Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica]. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26010>
- Pernía, T., Corao, G., & Araujo, L. (2004). Actividad Anti-inflamatoria de la Hialuronidasa por los polifenoles en la fruta de la fresa (*Fragaria vesca* L.). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.*, 3(4). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85630405>
- Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ.*, 15(1), 115-121. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2015.115.121>
- Rashid, M., Miah, K., Parvez, M., Hossian, N., Sikder, A., & Kaiser, M. (2011). Membrane stabilizing activity-A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of two bangladeshi medicinal plants: *Mesua Nagassarium* (Burm.F.) and *Kigelia Pinnata* (Jack)DC. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development (IJPRD)*., 3, 1-5.
- Rivera Guilcapi, M. J. (2018). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de Sigesbeckia serrata DC.* [Pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/9558>
- Rodríguez, M. F. (2012). *Inmunología ocular*. Universidad de La Salle.
- Romero-Estrada, A., Maldonado-Magaña, A., González-Christen, J., Bahena, S. M., Garduño-Ramírez, M. L., Rodríguez-López, V., & Alvarez, L. (2016). Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1397-1>
- Salazar López, J. Á., Villanueva Lendecky, M. A., García Hernández, E., & Soto Ojeda, G. A. (2018). Actividad antiinflamatoria in vitro de los extractos etanólico y hexánico de tallos de *Cuscuta jalapensis* Schltdl. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 75, 20-27.



- Samad, N. B., Debnath, T., Ye, M., Hasnat, Md. A., & Lim, B. O. (2014). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10), 807-815. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1008>
- Sánchez Chino, X., Ruíz Ruíz, J., Salazar Vega, M., Méndez Flores, O., & Olvio Vidal, Z. E. (2019). Compuestos Fenólicos y Actividad Antiinflamatoria in vitro, de extractos de *Tradescantia zebrina*. *INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y AGROTECNOLÓGICAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA*, 451.
- Santos, C., Rosas, J., Senabre, M., Santos-Soler, G., Salas, E., Barber, X., & Sánchez, M. (2012). *Revista de la Sociedad Valenciana de Reumatología: Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)*.
- Saravanan, S., Islam, V. I. H., David, H. A., Sundaram, R. L., Chellappandian, M., Balakrishna, K., Rajendran, R., Vijayaraghavan, P., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2015). Bioassay guided fractionation and identification of active anti-inflammatory constituent from *Delonix elata* flowers using RAW 264.7 cells. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 174-184. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913067>
- Shaikh, R. U., Pund, M. M., & Gacche, R. N. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.07.001>
- Sharma, N., Samarakoon, K. W., Gyawali, R., Park, Y.-H., Lee, S.-J., Oh, S. J., Lee, T.-H., & Jeong, D. K. (2014). Evaluation of the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities of *Euphorbia hirta* Ethanolic Extract. *Molecules*, 19(9), 14567-14581. <https://doi.org/10.3390/molecules190914567>
- Silva, D., Rico, J., Partata, E., Rivas, J., Correa, B., Spolidorio, L., & Palomari, D. (2011). *Acta Odontológica Venezolana: El papel del óxido nítrico en la modulación del proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal*. 49(4). <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2011/4/art-24/>
- Sumathi, S., & Anuradha, R. (2016). In vitro anti-inflammatory activity of flower extract of *Couroupita guianensis* Aubl. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(5), 05-08.
- Sunmathi, D., Sivakumar, R., & Ravikumar, K. (2016). In vitro Anti-inflammatory and Antiarthritic activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R. BR. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN PHARMACY, BIOLOGY AND CHEMISTRY*, 5(2), 109-115.



- Taofiq, O., Calhelha, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821-827. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.044>
- Tian, C., Zhang, P., Yang, C., Gao, X., Wang, H., Guo, Y., & Liu, M. (2018, marzo 13). *Extraction Process, Component Analysis, and In Vitro Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities of Total Flavonoid Extracts from Abutilon theophrasti Medic. Leaves* [Research Article]. *Mediators of Inflammation*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2018/3508506>
- Titos Rodríguez. (2004). *BIOSÍNTESIS DE MEDIADORES LIPÍDICOS DERIVADOS DE LA 5-LIPOXIGENASA EN EL SINUSOIDE HEPÁTICO. IMPLICACIONES EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA*. [Universidad de Barcelona]. [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2996/TESIS\\_ETitos.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2996/TESIS_ETitos.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Toledo Valdés, G. (2015). *ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE 15-LIPOXIGENASA DE SOYA POR UNA SERIE DE BENCIL FENIL CETONAS POLIHIDROXILADAS* [Universidad de Santiago de Chile]. [https://www.cibap.usach.cl/sites/cibap/files/documentos/resumen\\_tesis\\_de\\_pregrado\\_giannina\\_toledo\\_2015.pdf](https://www.cibap.usach.cl/sites/cibap/files/documentos/resumen_tesis_de_pregrado_giannina_toledo_2015.pdf)
- Torres Carro, Isla, M., Thomas-Valdes S, Jiménez-Aspee F, Schmeda-Hirschmann G, & Mr, A. (2017). Inhibition of pro-inflammatory enzymes by medicinal plants from the Argentinean highlands (Puna). *Journal of Ethnopharmacology*, 205, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.013>
- Truong, D.-H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019, febrero 3). *Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of Severinia buxifolia* [Research Article]. *Journal of Food Quality*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>
- Ullah, H. M. A., Zaman, S., Juhara, F., Akter, L., Tareq, S. M., Masum, E. H., & Bhattacharjee, R. (2014). Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of Curcuma zedoaria rhizome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 346. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-346>
- Us-Medina, U., Millán-Linares, M. del C., Arana-Argaes, V. E., Segura-Campos, M. R., Us-Medina, U., Millán-Linares, M. del C., Arana-Argaes, V. E., & Segura-Campos, M. R. (2020). Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de extractos de chaya (Cnidocolus



- aconitifolius (Mill.) I.M. Johnst). *Nutrición Hospitalaria*, 37(1), 46-55.  
<https://doi.org/10.20960/nh.02752>
- Vajravijayan, S., Udayakumar, M., Brabakaran, A., & Thangaraju, N. (2013). Anti-inflammatory, Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Nyctanthes Arbor-Tristis* Linn. Seed Extract Under In Vitro. *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*, 1(6), 1-5.
- Valdés, L., Arias, Q., Ramírez, J., & Peña, D. (2018). *Revista Cubana de Química. Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de extractos etanólicos de Jatropha aethiopica Müell Arg var inermis*. 30, 440-453.
- Valdés-Izaguirre, L. E., Arias-Cedeño, Q., Ramírez-Arzuaga, J., & Peña-Fuentes, D. (2018). Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de extractos etanólicos de *Jatropha aethiopica* Müell Arg var inermis. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 440-453.
- Velásquez, S., & Posada, V. (2013). *ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CORTEZA INTERNA DE Tabebuia chrysantha (JACQ.) G.NICHOLSON*. [Universidad Tecnológica de Pererira]. [recursosbiblioteca.utp.edu.com](http://recursosbiblioteca.utp.edu.com)
- Vera Abanto, M. N., & Zavaleta Minchola, M. M. (2019). *Comparación de la actividad antiinflamatoria in vitro de los extractos de hojas y flores de Echeveria peruviana Meyen* [Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/14259>
- Villa-De La Torre, F., Puebla-Pérez, A. M., Arana-Argaez, V. E., Ortiz-Andrade, R., Carballo-Uicab, G., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Borges-Argáez, R., Villa-De La Torre, F., Puebla-Pérez, A. M., Arana-Argaez, V. E., Ortiz-Andrade, R., Carballo-Uicab, G., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., & Borges-Argáez, R. (2017). Anti-inflammatory activity of *critonia aromatisans* and *montanoa grandiflora* leaves extracts, plants used in mayan traditional medicine to treat inflammation. *Polibotánica*, 43, 285-319.  
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.43.13>
- Villalba Herrera, E. W. (2014, mayo). *Revista de Actualización Clínica Investiga. - Inflamación I*. [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext)
- Villarroel Dorrego, M. (2015). *MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y SU IMPORTANCIA EN ODONTOLOGÍA. REVISIÓN DE LA LITERATURA*. [https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/moleculas\\_adhesion\\_importancia.asp](https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/moleculas_adhesion_importancia.asp)
- Waterman, C., Cheng, D. M., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Dreifus, J., Lila, M. A., & Raskin, I. (2014). Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*, 103, 114-122.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.028>



- Wu, G.-J., Shiu, S.-M., Hsieh, M.-C., & Tsai, G.-J. (2016). Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocolloids*, 53, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.019>
- Xanthopoulou, M. N., Fragopoulou, E., Kalathara, K., Nomikos, T., Karantonis, H. C., & Antonopoulou, S. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*, 120(3), 665-672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.058>
- Yadav, A. R., & Mohite, S. K. (2020). *Screening of In-vitro anti-inflammatory and Antibacterial assay of Malvastrum Coromandelianum*. 11(04), 3.
- Yanza Moreno, M. (2017). "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLORES Y HOJAS DE *Oreocallis grandiflora* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. [dspace.esPOCH.edu.ec](https://dspace.esPOCH.edu.ec)
- Yuniarti, N., Nugroho, P., Asyhar, A., Ikawati, Z., & Istyastono, P. (2012). In vitro and In Silico Studies on Curcumin and Its Analogues as Dual Inhibitors for cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). *ITB Journal*, 44(1), 51-66.
- Zakaria, M. B., Vijayasekaran, Ilham, Z., & Muhamad, N. A. (2014). Anti-inflammatory Activity of Calophyllum Inophyllum Fruits Extracts. *Procedia Chemistry*, 13, 218-220. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.031>
- Zhang, J., Zhang, Q., Xu, Y., Li, H., Zhao, F., Wang, C., Liu, Z., Liu, P., Liu, Y., Meng, Q., & Zhao, F. (2019). Synthesis and In Vitro Anti-inflammatory Activity of C20 Epimeric Ocotillol-Type Triterpenes and Protopanaxadiol. *Planta Medica*, 85(04), 292-301. <https://doi.org/10.1055/a-0770-0994>
- Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M.-H., Ho, C.-T., Simon, J. E., & Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food Chemistry*, 190, 673-680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.006>

# ANEXOS

## Anexo 1. COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay Kit ítem No.700100

### TABLE OF CONTENTS

<b>GENERAL INFORMATION</b>	<b>3</b>	<b>Materials Supplied</b>
	<b>4</b>	<b>Precautions</b>
	<b>4</b>	<b>If You Have Problems</b>
	<b>4</b>	<b>Storage and Stability</b>
	<b>4</b>	<b>Materials Needed but Not Supplied</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>	<b>Background</b>
	<b>5</b>	<b>About This Assay</b>
<b>PRE-ASSAY PREPARATION</b>	<b>7</b>	<b>Reagent Preparation</b>
<b>ASSAY PROTOCOL</b>	<b>9</b>	<b>Plate Set Up</b>
	<b>11</b>	<b>Performing the Assay</b>
<b>ANALYSIS</b>	<b>12</b>	<b>Calculations</b>
	<b>12</b>	<b>Performance Characteristics</b>
<b>RESOURCES</b>	<b>15</b>	<b>Inferences</b>
	<b>15</b>	<b>Troubleshooting</b>
	<b>16</b>	<b>References</b>
	<b>17</b>	<b>Related Products</b>
	<b>18</b>	<b>Warranty and Limitation of Remedy</b>
	<b>19</b>	<b>Plate Template</b>
	<b>20</b>	<b>Notes</b>

### GENERAL INFORMATION

#### Materials Supplied

Kit will arrive packaged as a -80°C kit. For best results, remove components and store as stated below.

Item Number	Item	Quantity	Storage
700101	COX-FIS Assay Buffer (10X)	1 vial	-20°C
700102	COX-FIS Heme	1 vial	-20°C
700103	COX-1 (ovine) COX-FIS Assay Reagent	1 vial	-80°C
700104	COX-2 (human recombinant) COX-FIS Assay Reagent	1 vial	-80°C
700105	COX-FIS Arachidonic Acid	1 vial	-20°C
700106	COX-FIS Potassium Hydroxide	1 vial	-20°C
700001	DMSO Assay Reagent	1 vial/3 ml	-20°C
700002	ADHP Assay Reagent	4 vials	-20°C
760158	DuP-697 Assay Reagent	1 vial	-20°C
760159	SC-560 Assay Reagent	1 vial	-20°C
400017	96-Well Plate (black)	1 plate	Room temperature
400012	96-Well Cover Sheet	1 cover	Room temperature

If any of the items listed above are damaged or missing, please contact our Customer Service department at (800) 364-9897 or (734) 975-3999. We cannot accept any returns without prior authorization.



**WARNING:** This product is for laboratory research use only: not for administration to humans. Not for human or veterinary diagnostic or therapeutic use.

### Precautions

Please read these instructions carefully before beginning this assay.

For research use only. Not for human or diagnostic use.

### If You Have Problems

#### Technical Service Contact Information

Phone: 888-526-5351 (USA and Canada only) or 734-975-3888

Fax: 734-971-3641

Email: techserv@caymanchem.com

Hours: M-F 8:00 AM to 5:30 PM EST

In order for our staff to assist you quickly and efficiently, please be ready to supply the lot number of the kit (found on the outside of the box).

### Storage and Stability

This kit will perform as specified if stored as directed in the **Materials Supplied** section, on page 3, and used before the expiration date indicated on the outside of the box.

### Materials Needed But Not Supplied

1. A fluorometer with the capacity to measure fluorescence using an excitation wavelength between 530-540 nm and an emission wavelength between 585-595 nm
2. Adjustable pipettes and a repeat pipettor
3. A source of pure water; glass distilled water or HPLC-grade water is acceptable

## INTRODUCTION

### Background

Cyclooxygenase (COX, also called Prostaglandin H Synthase or PGHS) is a bifunctional enzyme exhibiting both COX and peroxidase activities. The COX component converts arachidonic acid to a hydroperoxy endoperoxide (PGG<sub>2</sub>), and the peroxidase component reduces the endoperoxide to the corresponding alcohol (PGH<sub>2</sub>), the precursor of PGs, thromboxanes, and prostacyclins.<sup>1,2</sup>

It is now well established that there are two distinct isoforms of COX. COX-1 is constitutively expressed in a variety of cell types and is involved in normal cellular homeostasis. A variety of stimuli, such as phorbol esters, lipopolysaccharides, and cytokines, lead to the induced expression of a second isoform of COX, COX-2. COX-2 is responsible for the biosynthesis of PGs under acute inflammatory conditions.<sup>3,4</sup> This inducible COX-2 is believed to be the target enzyme for the anti-inflammatory activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.<sup>4</sup>

### About This Assay

Cayman's COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay provides a convenient fluorescence-based method for screening both ovine COX-1 and human recombinant COX-2 for isozyme-specific inhibitors. The assay utilizes the peroxidase component of COXs. The reaction between PGG<sub>2</sub> and ADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) produces the highly fluorescent compound resorufin. Resorufin fluorescence can be easily analyzed with an excitation wavelength of 530-540 nm and an emission wavelength of 585-595 nm (see Figure 1 on page 6).

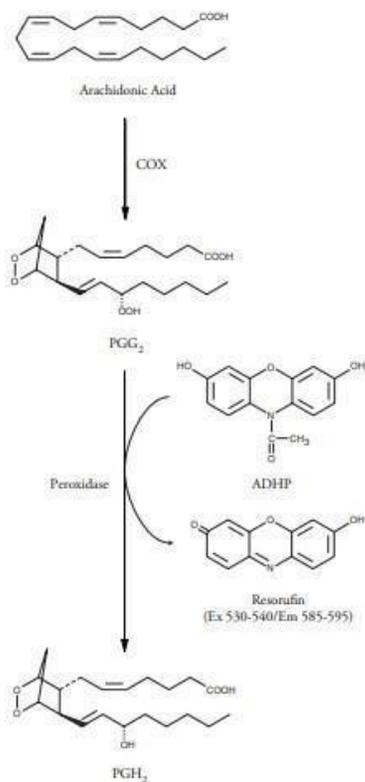


Figure 1. Assay scheme

## PRE-ASSAY PREPARATION

## Reagent Preparation

## 1. Assay Buffer (10X) - (Item No. 700101)

Dilute 3 ml of Assay Buffer concentrate with 27 ml of HPLC-grade water. This final Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) should be used in the assay and for diluting reagents. When stored at 4°C, this diluted buffer is stable for at least six months.

## 2. Heme - (Item No. 700102)

The vial contains 150 µl of heme in dimethylsulfoxide (DMSO). Dilute 40 µl of Heme with 960 µl of diluted Assay Buffer. The diluted Heme is stable for 12 hours at room temperature.

## 3. COX-1 (ovine) - (Item No. 700103)

The vial contains a solution of ovine COX-1 and should be kept on ice when thawed. Dilute 50 µl of enzyme with 550 µl of diluted Assay Buffer and store on ice. This is enough enzyme to use in 60 wells. Adjust the volume accordingly if assaying more wells. The diluted enzyme is stable for one hour. There is enough COX-1 supplied to assay 96 wells.

## 4. COX-2 (human recombinant) - (Item No. 700104)

The vial contains a solution of human recombinant COX-2 and should be kept on ice when thawed. Dilute 50 µl of enzyme with 550 µl of diluted Assay Buffer and store on ice. This is enough enzyme to use in 60 wells. Adjust the volume accordingly if assaying more wells. The diluted enzyme is stable for one hour. There is enough COX-2 supplied to assay 96 wells.

## 5. Arachidonic Acid - (Item No. 700105)

The vial contains a solution of arachidonic acid in ethanol. Transfer 100 µl of the supplied solution to another vial, add 100 µl of Potassium Hydroxide (KOH) (Item No. 700106), vortex, and dilute with 800 µl of HPLC-grade water to achieve a final concentration of 2 mM. Use the prepared Arachidonic Acid solution within 30 minutes. A 10 µl aliquot will yield a final concentration of 100 µM in the wells. If a lower concentration is desired, dilute further with HPLC-grade water and use within 30 minutes.

**6. Potassium Hydroxide - (Item No. 700106)**

The vial contains 0.1 M potassium hydroxide (KOH). The reagent is ready to use as supplied.

**7. DMSO Assay Reagent - (Item No. 700001)**

The vial contains 3 ml of dimethylsulfoxide (DMSO). The reagent is ready to use as supplied.

**8. ADHP Assay Reagent - (Item No. 700002)**

The vials contain a clear lyophilized powder of ADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine). Immediately prior to assaying, dissolve the contents of one vial with 100 µl DMSO Assay Reagent (Item No. 700001) and then add 900 µl of diluted Assay Buffer. The reconstituted substrate is stable for 30 minutes. After 30 minutes, increased background fluorescence will occur.

**9. DuP-697 - (Item No. 760158) - optional**

The vial contains 6 µM DuP-697 in DMSO. DuP-697 is a potent inhibitor of COX-2.<sup>5</sup> DuP-697 can be used as a control for screening COX-2 inhibitors. Dilute 50 µl of DuP-697 with 550 µl of DMSO Assay Reagent (Item No. 700001). Assaying 10 µl with COX-2 will yield approximately 50% inhibition (see Figure 4 on page 14).

**10. SC-560 - (Item No. 760159) - optional**

The vial contains 6.6 µM SC-560 in DMSO. SC-560 is a potent inhibitor of COX-1.<sup>6</sup> SC-560 can be used as a control for screening COX-1 inhibitors. Dilute 15 µl of SC-560 with 985 µl of DMSO Assay Reagent (Item No. 700001). Assaying 10 µl with COX-1 will yield approximately 50% inhibition (see Figure 3 on page 13).

**ASSAY PROTOCOL**

**Plate Set Up**

There is no specific pattern for using the wells on the plate. However, it is necessary to have three wells designated as 100% initial activity and three wells designated as background wells. We suggest that each inhibitor sample be assayed in triplicate and that you record the contents of each well on the template sheet provided on page 19. A typical layout of samples and compounds to be measured in triplicate is given below (see Figure 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BW	BW	BW	7	7	7	15	15	15	23	23	23
B	A	A	A	8	8	8	16	16	16	24	24	24
C	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
D	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
E	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
F	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
H	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30

BW - Background Wells  
 A - 100% Initial Activity Wells  
 1-30 - Inhibitor Wells

**Figure 2. Sample plate format**



#### Pipetting Hints

- It is recommended that an adjustable pipette be used to deliver reagents to the wells.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (*i.e.*, slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
- Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the well.

#### General Information

- The final volume of the assay is 200  $\mu$ l in all the wells.
- Use the diluted Assay Buffer in the assay.
- All reagents except the enzymes must be equilibrated to room temperature before beginning the assay.
- It is not necessary to use all the wells on the plate at one time.
- You do not have to use both enzymes. You can use either COX-1 or COX-2 for the study.
- We recommend assaying samples in triplicate, but it is the user's discretion to do so.
- Thirty inhibitor samples can be assayed in triplicate or forty-six in duplicate.
- The assay is performed at room temperature.
- Monitor the fluorescence with an excitation wavelength between 530-540 nm and an emission wavelength between 585-595 nm.
- Initiate the reactions with arachidonic acid while in close proximity to the fluorometer as it is necessary to read the plate two minutes after initiation of the reaction.

#### Performing the Assay

1. **100% Initial Activity Wells** - add 150  $\mu$ l of Assay Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, 10  $\mu$ l of ADHP, 10  $\mu$ l of enzyme (either COX-1 or COX-2), and 10  $\mu$ l of solvent (the same solvent used to dissolve the inhibitor) to three wells.
2. **Background Wells** - add 160  $\mu$ l of Assay Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, 10  $\mu$ l of ADHP, and 10  $\mu$ l of solvent (the same solvent used to dissolve the inhibitor) to three wells.
3. **Inhibitor Wells** - add 150  $\mu$ l of Assay Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, 10  $\mu$ l of ADHP, 10  $\mu$ l of enzyme (either COX-1 or COX-2), and 10  $\mu$ l of inhibitor\* to three wells.
4. Initiate the reactions by **quickly** adding 10  $\mu$ l of Arachidonic Acid solution to all the wells being used.
5. Incubate for two minutes at room temperature.
6. Read the plate using an excitation wavelength between 530-540 nm and an emission wavelength between 585-595 nm. It may be necessary to adjust the gain setting on the instrument to allow for the measurement of all the samples.

\*Inhibitors can be dissolved in Assay Buffer, methanol, ethanol, or DMSO and should be added to the assay in a final volume of 10  $\mu$ l. In the event that the appropriate concentration of inhibitor needed for COX inhibition is completely unknown, we recommend that several dilutions of the inhibitor be assayed.

## ANALYSIS

### Calculations

1. Determine the average fluorescence of each sample.
2. Subtract the fluorescence of the background wells from the fluorescence of the 100% initial activity and the inhibitor wells.
3. Determine the percent inhibition for each sample. To do this, subtract each inhibitor sample value from the 100% initial activity sample value. Divide the result by the 100% initial activity value and then multiply by 100 to give the percent inhibition.
4. Graph either the Percent Inhibition or Percent Initial Activity as a function of the inhibitor concentration to determine the  $IC_{50}$  value (concentration at which there was 50% inhibition). Examples of COX-1 and COX-2 inhibition by SC-560 and DuP-697, respectively are shown in Figures 3 and 4 (see pages 13 and 14, respectively).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[\text{Initial Activity} - \text{Sample Activity}]}{\text{Initial Activity}} \times 100$$

### Performance Characteristics

#### Precision:

When a series of ten COX measurements were performed on the same day, the intra-assay coefficient of variation was 2.6%. When a series of ten COX measurements were performed on five different days under the same experimental conditions, the inter-assay coefficient of variation was 2.8%.

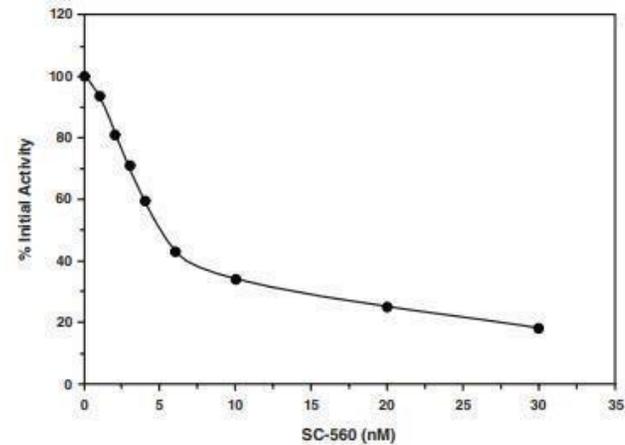


Figure 3. Inhibition of ovine COX-1 by SC-560 ( $IC_{50} = 5 \text{ nM}$ )

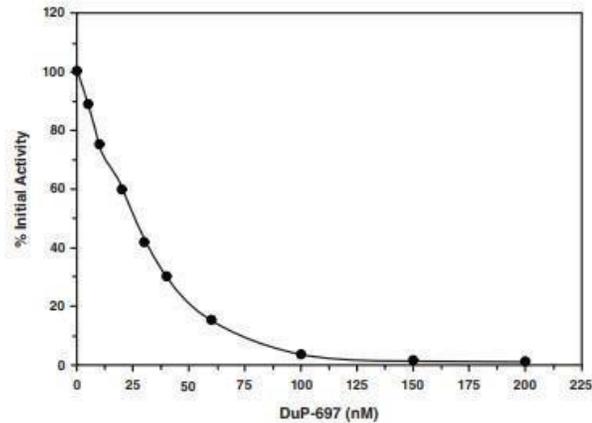


Figure 4. Inhibition of human recombinant COX-2 by DuP-697 ( $IC_{50} = 25$  nM)

## RESOURCES

### Interferences

Any antioxidant will interfere with the assay and will appear to be a COX inhibitor. Resveratrol is an antioxidant, as well as, a selective inhibitor of COX-1.<sup>7</sup> Using this assay, Resveratrol will also appear to be a COX-2 inhibitor. If the inhibitor being assayed is also an antioxidant, it is recommended that one of Cayman's COX Inhibitor Screening Assays, which utilizes an EIA detection (Item Nos. 560101 or 560131) be used for the inhibition analysis.

### Troubleshooting

Problem	Possible Causes	Recommended Solutions
Erratic values; dispersion of duplicates/triplicates	A. Poor pipetting/technique B. Bubble in the well(s)	A. Be careful not to splash the contents of the wells B. Carefully tap the side of the plate with your finger to remove bubbles
No fluorescence detected above background in the inhibitor wells	A. Enzymes were not added to the wells B. Inhibitor concentration was high enough to knock out all of the COX activity	A. Make sure to add all the components to the wells and re-assay B. Reduce the inhibitor concentration and re-assay
The fluorometer exhibited 'MAX' values for the wells	The GAIN setting is too high	Reduce the GAIN and re-read
No inhibition seen with compound	A. The compound concentration is not high enough B. The compound is not an inhibitor of the enzyme	Increase the compound concentration and re-assay



### References

1. Nugteren, D.H. and Hazelhof, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 448-461 (1973).
2. Hamberg, M. and Samuelsson, B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 899-903 (1973).
3. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., *et al.* Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2692-2696 (1991).
4. Blobaum, A.L. and Marnett, L.J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J. Med. Chem.* **50**(7), 1425-1441 (2007).
5. Kargman, S., Wong, E., Greig, G.M., *et al.* Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1113-1125 (1996).
6. Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., *et al.* Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13313-13318 (1998).
7. Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220 (1997).

### Related Products

- COX Activity Assay Kit - Item No. 760151
- COX Fluorescent Activity Assay Kit - Item No. 700200
- COX Inhibitor Screening Assay - Item No. 560131
- COX (ovine) Inhibitor Screening Assay - Item No. 560101
- Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay - Item No. 760111
- COX-1 (ovine) - Item No. 60100
- COX-2 (human recombinant) - Item No. 60122
- COX-2 (ovine) - Item No. 60120



---

## Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit

---

Item No. 760700

---

[www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)  
Customer Service 800.364.9897  
Technical Support 888.526.5351  
1180 E. Ellsworth Rd - Ann Arbor, MI - USA

## TABLE OF CONTENTS

GENERAL INFORMATION	3	Materials Supplied
	4	Safety Data
	4	Precautions
	4	If You Have Problems
	5	Storage and Stability
	5	Materials Needed but Not Supplied
INTRODUCTION	6	Background
	6	About This Assay
PRE-ASSAY PREPARATION	7	Reagent Preparation
	9	Enzyme Preparation
ASSAY PROTOCOL	10	Plate Set Up
	12	Performing the Assay
ANALYSIS	14	Calculations
	16	Performance Characteristics
RESOURCES	18	Interferences
	20	Troubleshooting
	21	References
	22	Plate Template
	23	Notes
	23	Warranty and Limitation of Remedy

## GENERAL INFORMATION

### Materials Supplied

Kit will arrive packaged as a -20°C kit. For best results, remove components and store as stated below.

Item Number	Item	Quantity/Size	Storage
760710	Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Buffer (10X)	1 vial	4°C
760711	Developing Reagent 1	1 vial	4°C
760712	Developing Reagent 2	1 vial	4°C
760714	15-Lipoxygenase Standard	1 vial	4°C
760715	Arachidonic Acid (substrate)	1 vial	-20°C
760716	Linoleic Acid (substrate)	1 vial	-20°C
760713	Potassium Hydroxide	1 vial	4°C
760717	Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) Positive Control Inhibitor	1 vial	-20°C
400014	96-Well Solid Plate (Colorimetric Assay)	1 plate	RT
400012	96-Well Cover Sheet	1 cover	RT

If any of the items listed above are damaged or missing, please contact our Customer Service department at (800) 364-9897 or (734) 971-3335. We cannot accept any returns without prior authorization.



**!** **WARNING: THIS PRODUCT IS FOR RESEARCH ONLY - NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.**

### Safety Data

This material should be considered hazardous until further information becomes available. Do not ingest, inhale, get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. Before use, the user must review the complete Safety Data Sheet, which has been sent *via* email to your institution.

### Precautions

Please read these instructions carefully before beginning this assay.

### If You Have Problems

#### Technical Service Contact Information

Phone: 888-526-5351 (USA and Canada only) or 734-975-3888  
Fax: 734-971-3641  
Email: techserv@caymanchem.com  
Hours: M-F 8:00 AM to 5:30 PM EST

In order for our staff to assist you quickly and efficiently, please be ready to supply the lot number of the kit (found on the outside of the box).

### Storage and Stability

This kit will perform as specified if stored as directed in the **Materials Supplied** section, see page 3, and used before the expiration date indicated on the outside of the box.

### Materials Needed But Not Supplied

1. A plate reader capable of measuring absorbance between 490-500 nm
2. Adjustable pipettors and a repeating pipettor
3. A source of pure water. Glass distilled water or HPLC-grade water is acceptable
4. Hydrogen peroxide (420  $\mu$ M)
5. Methanol to resuspend the inhibitor



## INTRODUCTION

### Background

Lipoxygenases (LOs) are non-heme iron-containing dioxygenases that catalyze the addition of molecular oxygen to fatty acids containing a *cis,cis*-1,4-pentadiene system. The initial product of this reaction is a 4-hydroperoxy *cis-trans*-1,3-conjugated pentadienyl moiety within the unsaturated fatty acid.<sup>1,2</sup> The three main LO enzymes are designated 5-, 12-, and 15-LO based on the position of the introduced hydroperoxide. Linoleate and arachidonate are the common substrates for LOs in plants and animals.

### About This Assay

Cayman's Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit detects and measures the hydroperoxides produced in the lipoxygenation reaction using a purified LO. The detection reaction is equally sensitive to hydroperoxides at various positions within the fatty acid, and will work with fatty acids of any carbon length. It is thus a general detection method for LO, and can be used to screen libraries of compounds for those which inhibit LO enzymes.

## PRE-ASSAY PREPARATION

### Reagent Preparation

- Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Buffer (10X) - (Item No. 760710)**  
Dilute 3 ml of Assay Buffer concentrate with 27 ml of HPLC-grade water. This final 1X Assay Buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4) should be used for dilution of samples and the 15-LO standard prior to assaying. When stored at 4°C, this 1X Assay Buffer is stable for at least two months.
- Developing Reagent 1 - (Item No. 760711)**  
The reagent is ready to use as supplied.
- Developing Reagent 2 - (Item No. 760712)**  
The reagent is ready to use as supplied.
- Chromogen**  
Prepare the Chromogen prior to use by mixing equal volumes of Developing Reagent 1 (Item No. 760711) and Developing Reagent 2 (Item No. 760712) in a test tube and vortexing. The volume of Chromogen to be prepared is dependent on the number of wells assayed. Calculate 100 µl for each well. Use the Chromogen within one hour.
- 15-Lipoxygenase Standard - (Item No. 760714)**  
A solution of 15-LO (soybean) is supplied as a positive control. Transfer 10 µl of the supplied enzyme to another vial and dilute with 990 µl of 1X Assay Buffer prior to use, store on ice, and use within one hour.

**6. Arachidonic Acid (substrate) - (Item No. 760715)**

This vial contains a solution of arachidonic acid in ethanol and should be stored at -20°C when not being used. Transfer 25 µl of the supplied substrate to another vial, add 25 µl of Potassium Hydroxide (Item No. 760713), vortex, and dilute with 950 µl of HPLC-grade water to achieve a working concentration of 1 mM. Use the prepared arachidonic acid solution within 30 minutes. A 10 µl aliquot will yield a reaction concentration of 91 µM in the wells. *NOTE: You can use either arachidonic or linoleic acid in the assay. You do not have to use both.*

**7. Linoleic Acid (substrate) - (Item No. 760716)**

This vial contains a solution of linoleic acid in ethanol and should be stored at -20°C when not being used. Transfer 25 µl of the supplied substrate to another vial, add 25 µl of Potassium Hydroxide (Item No. 760713), vortex, and dilute with 950 µl of HPLC-grade water to achieve a working concentration of 1 mM. Use the prepared linoleic acid solution within 30 minutes. A 10 µl aliquot will yield a reaction concentration of 91 µM in the wells. *NOTE: You can use either arachidonic or linoleic acid in the assay. You do not have to use both.*

**8. Potassium Hydroxide - (Item No. 760713)**

This vial contains 0.1 M potassium hydroxide (KOH). The reagent is ready to use as supplied.

**9. NDGA Positive Control Inhibitor - (Item No. 760717)**

This vial contains 550 nmol of the non-selective lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Resuspend in 500 µl of 1X Assay Buffer to make a 1.1 mM stock. The addition of 10 µl to the assay yields a final concentration of 100 µM inhibitor in the well. *NOTE: Alternatively, inhibitors can be dissolved in methanol or dimethylsulfoxide (DMSO), however slightly decreased enzyme activity was observed with DMSO. Dimethylformamide (DMF) and ethanol dramatically reduce enzyme activity and thus they are not recommended for dissolving inhibitors.*

**Enzyme Preparation**

Cell lysates and tissue homogenates contain peroxidases (e.g., glutathione peroxidase) that will reduce the lipid hydroperoxides generated in the assay, resulting in a very low signal. To achieve the most accurate results, we recommend screening purified LOs (5-, 12-, or 15-LO) with this assay. The sample must be free of particulates to avoid interferences in the absorbance measurement. Phosphates, EDTA, transition metal ions, thiols, and any endogenous LO inhibitors must be removed from the samples before performing the assay (extensive dialysis or concentrating and reconstituting in a Tris Buffer several times will eliminate most of the interfering substances of small molecular size).

If the enzymes are too dilute, they can be concentrated using a membrane filter with a molecular weight cut-off of 30,000 Da (such as an Amicon centrifuge concentrator).

Cyclooxygenases should not be measured by this assay. If you are concerned that the activity seen in your sample is due to a cyclooxygenase (COX-1 or COX-2), then add a non-selective COX inhibitor (i.e., Indomethacin, Item No. 70270) as a control. *NOTE: Cayman's 5-LO (human recombinant, Item No. 60402) will not work in the assay. Follow the directions on the insert for diluting Cayman's 5-LO (potato) Screening Enzyme (Item No. 60401) prior to assaying. Dilute Cayman's 15-LO (soybean P1; Item No. 60700) 1:2,000 with diluted Assay Buffer (Item No. 760710) prior to assaying.*

## ASSAY PROTOCOL

### Plate Set Up

There is no specific pattern for using the wells on the plate. However, it is necessary to have some wells (at least two) designated as non-enzymatic controls (blanks). The absorbance of these wells must be subtracted from the absorbance measured in the sample wells. We suggest that you have at least two wells designated as positive controls. A typical layout of samples to be measured in duplicate is shown in Figure 1. We also suggest you record the contents of each well on the template sheet provided (see page22).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8	8	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
B	+	+	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
C	-	-	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
D	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
E	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
F	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
G	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
H	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45

B - Blank  
 + - Positive Control (15-LO Standard)  
 - - 100% Initial Activity wells  
 1-45 - Inhibitor wells

Figure 1. Sample plate format

### Pipetting Hints

- It is recommended that a repeating pipettor be used to deliver substrate and Chromogen to the wells.
- Use different tips to pipette sample, substrate, and Chromogen.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (*i.e.*, slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
- Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the well.

### General Information

- The final volume of the assay is 210  $\mu$ l in all the wells.
- It is not necessary to use all the wells on the plate at one time.
- If the appropriate inhibitor dilution is not known, it may be necessary to assay at several dilutions.
- Use the 1X Assay Buffer in the assay.
- It is recommended that samples be assayed at least in duplicate (triplicate preferred).
- The background absorbance (absorbance of the blank wells) should be <0.22.



### Performing the Assay

1. **Blank Wells** - add 100  $\mu$ l of Assay Buffer to at least two wells.
2. **Positive Control Wells (15-LO Standard)** - add 90  $\mu$ l 15-LO and 10  $\mu$ l of Assay Buffer to at least two wells.
3. **100% Initial Activity Wells** - add 90  $\mu$ l of lipoxygenase enzyme and 10  $\mu$ l of solvent (the same solvent used to dissolve the inhibitor) to at least two wells.
4. **Inhibitor Wells** - add 90  $\mu$ l of lipoxygenase enzyme and 10  $\mu$ l of inhibitor wells. NDGA Positive Control Inhibitor can be used as a positive control in the assay. *NOTE: Inhibitors can be dissolved in 1X Assay Buffer, methanol, or DMSO. Slightly reduced enzyme activity was seen with DMSO. Ethanol and DMF dramatically reduce enzyme activity and thus they are not recommended for dissolving inhibitors. The inhibitor should be added to the assay in a final volume of 10  $\mu$ l before initiating with substrate.*

Well	1X Assay Buffer	15-LO	Solvent	Inhibitor
Blank	100 $\mu$ l	-	-	-
Positive Control	10 $\mu$ l	90 $\mu$ l	-	-
100% Initial Activity	-	90 $\mu$ l	10 $\mu$ l	-
Inhibitor	-	90 $\mu$ l	-	10 $\mu$ l

5. Incubate for five minutes at room temperature.
6. Initiate the reaction by adding 10  $\mu$ l of substrate (either Arachidonic or Linoleic Acid) to all the wells. Place the 96-well plate on a shaker for at least ten minutes.
7. Add 100  $\mu$ l of Chromogen to each well to stop enzyme catalysis and develop the reaction. Cover with a plate cover and place the 96-well plate on a shaker for five minutes.
8. Remove the cover and read the absorbance at 490-500 nm using a plate reader.

## ANALYSIS

### Calculations

1. Determine the average absorbance of the blank, 100% initial activity (IA), and inhibitor wells.
2. Subtract the average absorbance of the Blank from the average absorbance of the 100% IA and inhibitor wells.
3. Determine the percent inhibition or percent IA for each inhibitor using one of the following equations.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{\text{IA} - \text{Inhibitor}}{\text{IA}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ IA} = \frac{\text{Inhibitor}}{\text{IA}} \times 100$$

4. Graph the Percent Inhibition or Percent Initial Activity as a function of the inhibitor concentration to determine the  $IC_{50}$  value (concentration at which there was 50% inhibition). Examples of soybean 15-LO inhibition by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is shown on page 15.

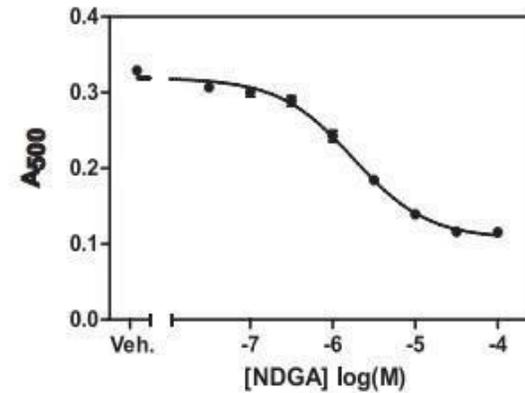


Figure 2. Inhibition of soybean 15-lipoxygenase by NDGA ( $IC_{50} = 1.6 \mu\text{M}$ ). Arachidonic Acid was used as the substrate in this experiment.

### Performance Characteristics

#### Sensitivity:

Under the standard conditions described in this booklet, samples containing LO activity between 1-10 nmol/min/ml can be assayed without further dilution or concentration. The assay will detect 0.5-5 nmol of lipid hydroperoxides.

#### Z' Factor:

Z' factor is a term used to describe the robustness of an assay,<sup>3</sup> which is calculated using the equation below.

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

Where  $\sigma$ : Standard deviation  
 $\mu$ : Mean  
 c+: Positive control  
 c-: Negative control

The theoretical upper limit for the Z' factor is 1.0. A robust assay has a Z' factor >0.5. The Z' factor for Cayman's Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit was determined to be 0.88.

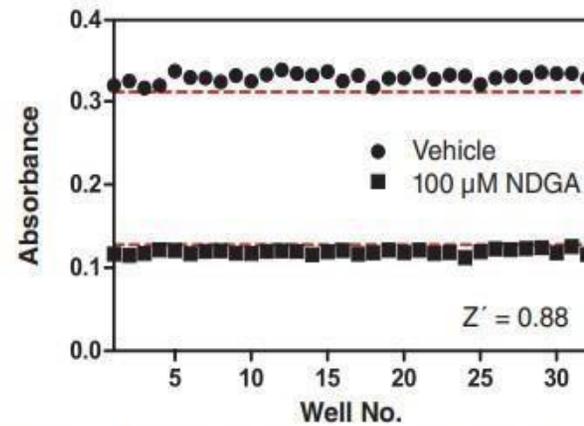


Figure 3. Typical Z' data for the Lipoxygenase Inhibitor Screening Kit. Data are shown from wells of both positive and negative controls prepared as described in the kit booklet. The calculated Z' factor from this experiment was 0.88. The red lines correspond to three standard deviations from the mean for each control value.



## RESOURCES

### Interferences

#### Culture Medium and Buffers

All buffers and medium should be tested for high background absorbances before doing any experiments. If the initial background absorbances are higher than 0.22 absorbance units then the samples should be diluted in 1X Assay Buffer or HPLC-grade water before performing the assay. Phosphate, HEPES, and EDTA interfere with the Chromogen and will result in no enzyme activity. Tris, borate, and EGTA work fine in the assay. DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) and MEM (Minimum Essential Medium Eagle) exhibit high background absorbances and should not be used in the assay. However, F-12 (Ham Nutrient Mixture) does not interfere with the assay.

#### Thiols and Transition Metal Ions

Buffers containing thiols (*i.e.*, glutathione, cysteine, dithiothreitol, or 2-mercaptoethanol) and transition metal ions (*i.e.*, Fe, Mn, or Cu) will exhibit high background absorbances and interfere with LO activity determination. Extensive dialysis will eliminate most of the interfering substances of small molecular size.

#### Solvents

Inhibitors can be dissolved in methanol or DMSO. However, reduced enzyme activity was observed in the presence of DMSO. The inhibitor should be added to the assay in 10  $\mu$ l.

### Inhibitors

LO inhibitors should be tested for assay interference by following the protocol outlined below:

1. **Blank Wells** - add 100  $\mu$ l of 1X Assay Buffer to at least two wells.
2. **Blank Wells plus Inhibitor Wells** - add 90  $\mu$ l of 1X Assay Buffer and 10  $\mu$ l of inhibitor to at least two wells.
3. **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Wells** - add 90  $\mu$ l of 1X Assay Buffer and 10  $\mu$ l of 420  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (not supplied in the kit) to at least two wells.
4. **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) plus Inhibitor Wells** - add 80  $\mu$ l of 1X Assay Buffer, 10  $\mu$ l of 420  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 10  $\mu$ l of inhibitor to at least two wells.
5. Initiate the reaction by adding 10  $\mu$ l of substrate (either Arachidonic Acid or Linoleic Acid) to all the wells. Place the 96-well plate on a shaker for ten minutes.
6. Add 100  $\mu$ l of Chromogen to each well and develop the reaction. Cover with a plate cover and place the 96-well plate on a shaker for five minutes.
7. Remove the cover and read the absorbance at 500 nm using a plate reader.

*NOTE: The blank plus inhibitor wells should not exhibit an absorbance >0.20. If the absorbance is above 0.20, then try diluting with 1X Assay Buffer or solvent the inhibitor is dissolved in. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wells and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus inhibitor wells should exhibit approximately the same absorbance. If the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus inhibitor wells exhibit an absorbance higher or lower than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wells, then the inhibitor is interfering with the assay. Try diluting the inhibitor with more 1X Assay Buffer or solvent.*



### Troubleshooting

Problem	Possible Causes	Recommended Solutions
Erratic values; dispersion of duplicates/triplicates	A. Poor pipetting/technique B. Bubble in the well(s)	A. Be careful not to splash the contents of the wells B. Carefully tap the side of the plate with your finger to remove bubbles
No color development	A. Enzyme, substrate, or Chromogen was not added to the well(s); enzyme activity was too low B. Something is interfering with the Chromogen	Make sure to add all components to the wells and standardize the assay with the 15-LO standard; concentrate the enzyme so that the activity falls within the range of the assay; see the Interference section (on page 18) to confirm that the enzyme does not contain something that will effect the performance of the assay
High background absorbance (>0.22)	There is something interfering with the assay	See the Interference section (on page 18)
No inhibition was seen with the inhibitor	A. The inhibitor concentration is not high enough B. The compound is not an inhibitor of the enzyme	Increase the inhibitor concentration and re-assay

### References

1. Gaffney, B.J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 431-459 (1996).
2. Yamamoto, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1128**, 117-131 (1992).
3. Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y., and Oldenburg, K.R. *J. Biomol. Screen.* **4(2)**, 67-73 (1999).



1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
	A	B	C	D	E	F	G	H	

NOTES

Warranty and Limitation of Remedy

Buyer agrees to purchase the material subject to Cayman's Terms and Conditions. Complete Terms and Conditions including Warranty and Limitation of Liability information can be found on our website.

This document is copyrighted. All rights are reserved. This document may not, in whole or part, be copied, photocopied, reproduced, translated, or reduced to any electronic medium or machine-readable form without prior consent, in writing, from Cayman Chemical Company.

©10/04/2017, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, All rights reserved. Printed in U.S.A.



---

## COX (ovine) Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit

---

Item No. 760111

[www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)  
Customer Service 800.364.9897  
Technical Support 888.526.5351  
1180 E. Ellsworth Rd · Ann Arbor, MI ·  
USA

**TABLE OF CONTENTS**

<b>GENERAL INFORMATION</b>	3	Materials Supplied
	4	Safety Data
	4	Precautions
	4	If You Have Problems
	4	Storage and Stability
	4	Materials Needed but Not Supplied
<b>INTRODUCTION</b>	5	Background
	5	About This Assay
<b>PRE-ASSAY PREPARATION</b>	6	Reagent Preparation
<b>ASSAY PROTOCOL</b>	8	Plate Set Up
	10	Performing the Assay
<b>ANALYSIS</b>	11	Calculations
<b>RESOURCES</b>	12	Interferences
	13	Troubleshooting
	13	References
	14	Plate Template
	15	Notes
	15	Warranty and Limitation of Remedy

**GENERAL INFORMATION****Materials Supplied**

Kit will arrive packaged as a -80°C kit. For best results, remove components and store as stated below.

Item Number	Item	Quantity	Storage
760114	Assay Buffer (10X)	2 vials	-20°C
760116	Hemin	2 vials	-20°C
760110	COX-1 (ovine)	1 vial	-80°C
760108	COX-2 (ovine recombinant)	1 vial	-80°C
760113	Arachidonic Acid (substrate)	2 vials	-80°C
760115	Potassium Hydroxide	2 vials	-20°C
760117	Colorimetric Substrate	2 vials	-20°C
400014	96-Well Plate (Colorimetric Assay)	2 plates	RT
400012	96-Well Cover Sheet	2 covers	RT

If any of the items listed above are damaged or missing, please contact our Customer Service department at (800) 364-9897 or (734) 971-3335. We cannot accept any returns without prior authorization.



**WARNING: THIS PRODUCT IS FOR RESEARCH ONLY - NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.**



## Safety Data

This material should be considered hazardous until further information becomes available. Do not ingest, inhale, get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. Before use, the user must review the complete Safety Data Sheet, which has been sent *via* email to your institution.

## Precautions

Please read these instructions carefully before beginning this assay.

## If You Have Problems

### Technical Service Contact Information

Phone: 888-526-5351 (USA and Canada only) or 734-975-3888  
Fax: 734-971-3640  
Email: techserv@caymanchem.com

In order for our staff to assist you quickly and efficiently, please be ready to supply the lot number of the kit (found on the outside of the box).

## Storage and Stability

This kit will perform as specified in the **Materials Supplied** section on page 3 and used before the expiration date indicated on the outside of the box.

## Materials Needed But Not Supplied

1. A plate reader capable of measuring absorbances between 590-611 nm
2. Adjustable pipettes and multichannel or repeating pipettes
3. A source of pure water; glass distilled water or HPLC-grade water is acceptable

## INTRODUCTION

### Background

Cyclooxygenase (COX, also called Prostaglandin H Synthase or PGHS) is a bifunctional enzyme exhibiting both COX and peroxidase activities. The COX component converts arachidonic acid to a hydroperoxy endoperoxide (PGG<sub>2</sub>), and the peroxidase component reduces the endoperoxide to the corresponding alcohol (PGH<sub>2</sub>), the precursor of PGs, thromboxanes, and prostacyclins.<sup>1,2</sup>

It is now well established that there are two distinct isoforms of COX, COX-1 is constitutively expressed in a variety of cell types and is involved in normal cellular homeostasis. A variety of mitogenic stimuli such as phorbol esters, lipopolysaccharides, and cytokines lead to the induced expression of a second isoform of COX, COX-2. COX-2 is responsible for the biosynthesis of PGs under acute inflammatory conditions.<sup>3</sup> This inducible COX-2 is believed to be the target enzyme for the anti-inflammatory activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

### About This Assay

Cayman's COX (ovine) Colorimetric Inhibitor Screening Assay measures the peroxidase component of COXs. The peroxidase activity is assayed colorimetrically by monitoring the appearance of oxidized N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) at 590 nm.<sup>4</sup> Inhibition of COX activity, by a variety of selective and nonselective inhibitors, showed potencies similar to those observed with other *in vitro* methods.

The COX (ovine) Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit includes both ovine COX-1 and COX-2 enzymes in order to screen isozyme-specific inhibitors. This COX assay is a time saving tool for screening vast numbers of inhibitors.



## PRE-ASSAY PREPARATION

### Reagent Preparation

#### 1. Assay Buffer (10X) - (Item No. 760114)

Dilute 3 ml of Assay Buffer concentrate with 27 ml of HPLC-grade water. This final Assay Buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8) should be used for dilution of Hemin and COX enzymes prior to assaying. When stored at 4°C, this diluted Assay Buffer is stable for at least two months.

#### 2. Hemin - (Item No. 760116)

Each vial contains 300 µl of Hemin in DMSO. Dilute 88 µl of Hemin with 1.912 ml of diluted Assay Buffer prior to use. This diluted Hemin is stable for 12 hours at room temperature.

#### 3. COX-1 (ovine) - (Item No. 760110)

This vial contains ovine COX-1 and should be kept on ice when thawed. Dilute 120 µl of enzyme with 360 µl of diluted Assay Buffer and store on ice. This is enough enzyme to assay approximately 48 wells. Scale the amounts accordingly if assaying a different number of wells. The diluted enzyme is stable for one hour. There is enough COX-1 supplied to assay 96 wells.

#### 4. COX-2 (ovine recombinant) - (Item No. 760108)

This vial contains recombinant ovine COX-2 and should be kept on ice when thawed. Dilute 120 µl of enzyme with 360 µl of diluted Assay Buffer and store on ice. This is enough enzyme to assay approximately 48 wells. Scale the amounts accordingly if assaying a different number of wells. The diluted enzyme is stable for one hour. There is enough COX-2 supplied to assay 96 wells.

#### 5. Arachidonic Acid (substrate) - (Item No. 760113)

This vial contains a solution of arachidonic acid in ethanol. Transfer 100 µl of the supplied substrate to another vial, add 100 µl of Potassium Hydroxide (Item No. 760115), vortex, and dilute with 1.8 ml of HPLC-grade water to achieve a final concentration of 1.1 mM. Use the prepared Arachidonic Acid solution within 30 minutes. A 20 µl aliquot will yield a final concentration of 100 µM in the wells. If a lower concentration is desired, dilute further with HPLC-grade water and use within 30 minutes.

#### 6. Potassium Hydroxide - (Item No. 760115)

This vial contains 0.1 M potassium hydroxide (KOH). The reagent is ready to use as supplied.

#### 7. Colorimetric Substrate - (Item No. 760117)

This vial contains a solution of TMPD. The reagent is ready to use as supplied.

## ASSAY PROTOCOL

### Plate Set Up

There is no specific pattern for using the wells on the plate. However, it is necessary to have three wells designated as non-enzymatic or background wells. The absorbance of these wells must be subtracted from the absorbance measured in the COX wells. We suggest that each COX sample be assayed in triplicate. We suggest you record the contents of each well on the template sheet provided on page 14.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BW	BW	BW	7	7	7	15	15	15	23	23	23
B	A	A	A	8	8	8	16	16	16	24	24	24
C	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
D	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
E	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
F	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
H	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30

BW - Background Wells  
 A - 100% Initial Activity Wells  
 1-30 - Inhibitor Wells

Figure 1. Sample plate format

### Pipetting Hints

- It is recommended that an adjustable pipette be used to deliver reagents to the wells.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (i.e., slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
- Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the well.

### General Information

- The final volume of the assay is 220  $\mu$ l in all the wells.
- If the appropriate inhibitor dilution is not known, it may be necessary to assay at several dilutions.
- Use the diluted Assay Buffer in the assay and pre-equilibrate to 25°C.
- We recommend assaying samples in triplicate, but it is the user's discretion.
- Initiate the reactions with Arachidonic Acid while in close proximity to the plate reader as it is necessary to read the plate precisely two minutes after initiation of the reaction.



### Performing the Assay

1. **Background Wells** - add 160  $\mu\text{l}$  of Assay Buffer and 10  $\mu\text{l}$  of Hemin to three wells.
2. **100% Initial Activity Wells** - add 150  $\mu\text{l}$  of Assay Buffer, 10  $\mu\text{l}$  of Hemin, and 10  $\mu\text{l}$  of enzyme (either COX-1 or COX-2) to three wells.
3. **Inhibitor Wells** - add 150  $\mu\text{l}$  of Assay Buffer, 10  $\mu\text{l}$  of Hemin, and 10  $\mu\text{l}$  of enzyme (either COX-1 or COX-2) to three wells.
4. Add 10  $\mu\text{l}$  of inhibitor\* to the Inhibitor wells and 10  $\mu\text{l}$  of solvent (same solvent used for dissolving inhibitor) to the 100% Initial Activity wells and background wells.
5. Carefully shake the plate for a few seconds and incubate for five minutes at 25°C. *NOTE: Most inhibitors exhibit time-dependent inhibition of COX activity. Altering incubation times with the inhibitor can significantly change the apparent  $IC_{50}$  value of the compound. Determining the optimal pre-incubation times for inhibitors is suggested.*
6. Add 20  $\mu\text{l}$  of the Colorimetric Substrate solution to all the wells that you are using.
7. Quickly add 20  $\mu\text{l}$  of Arachidonic Acid to all the wells you are using.
8. Carefully shake the plate for a few seconds and incubate for precisely two minutes at 25°C\*\*.
9. Read the absorbance at 590 nm.

\*Inhibitors can be dissolved in methanol, dimethylsulfoxide, or ethanol and should be added to the assay in a final volume of 10  $\mu\text{l}$ . In the event that the appropriate concentration of inhibitor is completely unknown, we recommend that several dilutions of the inhibitor be made.

\*\*For a more accurate determination of reaction rates and apparent  $IC_{50}$  values, we recommend reading the samples kinetically, collecting as many time points as possible for the two minute assay read time. Determine the initial rate based on the linear portion of the kinetic curve. Calculations can be performed as shown below substituting initial rates for absorbance.

10

ASSAY PROTOCOL

### ANALYSIS

#### Calculations

1. Determine the average absorbance of all the samples.
2. Subtract the absorbance of the background wells from absorbances of the 100% Initial Activity and the Inhibitor wells.
3. Subtract each Inhibitor Sample from the 100% Initial Activity Sample, then divide by the 100% Initial Activity Sample, and multiply by 100 to give the percent inhibition.
4. Either graph the Percent Inhibition or Percent Initial Activity by the Inhibitor Concentration to determine the  $IC_{50}$  value (concentration at which there was 50% inhibition).

ANALYSIS

11



## RESOURCES

### Interferences

#### Antioxidants

Any antioxidant will interfere with the assay and will appear to be a COX inhibitor. Resveratrol is an antioxidant, as well as, a selective inhibitor of COX-1.<sup>5</sup> Using this assay, Resveratrol will also appear to be a COX-2 inhibitor. If the inhibitor you are assaying is also an antioxidant, it is recommended that you use one of Cayman's COX Inhibitor Screening Assays which utilizes an EIA detection (Item Nos. 560101 or 560131).

#### Solvents

Methanol, dimethyl sulfoxide, and ethanol have no effect on COX activity. COX inhibitors can be dissolved in any of the above solvents and should be added to the assay in 10  $\mu$ l.

### Troubleshooting

Problem	Possible Causes	Recommended Solutions
Erratic values; dispersion of duplicates/triplicates	A. Poor pipetting/technique B. Bubble in the well(s)	A. Be careful not to splash the contents of the wells B. Carefully tap the side of the plate with your finger to remove bubbles
No absorbance above 0.1 is seen in the Inhibitor wells	A. Enzyme, Arachidonic Acid, or Colorimetric substrate was not added to the well(s) B. Inhibitor concentration is too high and inhibited all of the enzyme activity C. Something is interfering with the assay	A. Make sure to add all components to the wells B. Reduce the concentration of the inhibitor and re-assay C. Make sure you are not adding an antioxidant to the assay
No inhibition seen with inhibitor	The inhibitor concentration is not high enough or the compound is not an inhibitor of that enzyme	Increase the inhibitor concentration and re-assay

### References

1. Nugteren, D.H. and Hazelhof, E. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 448-461 (1973).
2. Hamberg, M. and Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 899-903 (1973).
3. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2692-2696 (1991).
4. Kulmacz, R.J. and Lands, W.E.M. *Prostaglandins* **25**, 531-540 (1983).
5. Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., et al. *Science* **275**, 218-220 (1997).



1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
	A	B	C	D	E	F	G	H	

NOTES

Warranty and Limitation of Remedy

Buyer agrees to purchase the material subject to Cayman's Terms and Conditions. Complete Terms and Conditions including Warranty and Limitation of Liability information can be found on our website.

This document is copyrighted. All rights are reserved. This document may not, in whole or part, be copied, photocopied, reproduced, translated, or reduced to any electronic medium or machine-readable form without prior consent, in writing, from Cayman Chemical Company.

©02/04/2020, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, All rights reserved. Printed in U.S.A.



---

COX-2 (human) Inhibitor Screening  
Assay Kit

---

Item No. 701080

[www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)  
Customer Service 800.364.9897  
Technical Support 888.526.5351  
1180 E. Ellsworth Rd · Ann Arbor, MI · USA

**TABLE OF CONTENTS**

<b>GENERAL INFORMATION</b>	3	Materials Supplied
	4	Safety Data
	4	Precautions
	4	If You Have Problems
	5	Storage and Stability
	5	Materials Needed but Not Supplied
<b>INTRODUCTION</b>	6	Background
	6	About This Assay
	7	Description of AChE Competitive ELISAs
	8	Biochemistry of Acetylcholinesterase
<b>COX REACTION PROCEDURE</b>	10	COX Reagent Preparation
	12	Performing COX Reactions
<b>ELISA PROCEDURE</b>	14	ELISA Buffer Preparation
	15	Preparation of Assay-Specific Reagents
	17	COX Reaction Dilutions
	18	Definition of Key Terms
	19	Plate Set Up
	20	Performing the ELISA
<b>ANALYSIS</b>	23	Calculations
	26	ELISA Performance Characteristics
<b>RESOURCES</b>	30	Interference
	32	Troubleshooting
	33	Additional Reading
	33	References
	34	Plate Template
	35	Notes
	35	Warranty and Limitation of Remedy

**GENERAL INFORMATION****Materials Supplied**

Kit will arrive packaged as a -80°C kit. For best results, remove components and store as stated below.

Item Number	Item	Quantity	Storage
414016	PG Screening ELISA Antiserum	1 vial	-20°C
414006	PG Screening AChE Tracer	1 vial	-20°C
414026	PG Screening ELISA Standard	1 vial	-20°C
400060	ELISA Buffer Concentrate (10X)	2 vials	RT
400062	Wash Buffer Concentrate (400X)	1 vial	RT
400035	Polysorbate 20	1 vial	RT
400004	Mouse Anti-Rabbit IgG Coated Plate	1 plate	4°C
400012	96-Well Cover Sheet	1 cover	RT
400050	Ellman's Reagent	3 vials	-20°C
460104	Reaction Buffer (10X)	1 vial	-20°C
460121	COX-2 (human recombinant)	2 vials	-80°C
460102	Heme	1 vial	-20°C
460103	Arachidonic Acid (substrate)	1 vial	-20°C
460105	Potassium Hydroxide	1 vial	-20°C
460106	Hydrochloric Acid	1 vial	-20°C
460107	Stannous Chloride	1 vial	-20°C

If any of the items listed above are damaged or missing, please contact our Customer Service department at (800) 364-9897 or (734) 971-3335. We cannot accept any returns without prior authorization.



**WARNING: THIS PRODUCT IS FOR RESEARCH ONLY - NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.**

### Safety Data

This material should be considered hazardous until further information becomes available. Do not ingest, inhale, get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. Before use, the user **must** review the **complete** Safety Data Sheet, which has been sent *via* email to your institution.

### Precautions

**Please read these instructions carefully before beginning this assay.**

The reagents in this kit have been tested and formulated to work exclusively with Cayman Chemical's AChE ELISA Kits. This kit may not perform as described if any reagent or procedure is replaced or modified.

### If You Have Problems

#### Technical Service Contact Information

Phone: 888-526-5351 (USA and Canada only) or 734-975-3888  
Fax: 734-971-3641  
Email: techserv@caymanchem.com  
Hours: M-F 8:00 AM to 5:30 PM EST

In order for our staff to assist you quickly and efficiently, please be ready to supply the lot number of the kit (found on the outside of the box).

### Storage and Stability

This kit will perform as specified if stored as specified in the **Materials Supplied** section, on page 3, and used before the expiration date indicated on the outside of the box.

### Materials Needed But Not Supplied

1. A plate reader capable of measuring absorbance between 405-420 nm.
2. Adjustable pipettes and a repeating or multichannel pipettor.
3. A source of 'UltraPure' water. Water used to prepare all ELISA reagents and buffers must be deionized and free of trace organic contaminants ('UltraPure'). Use activated carbon filter cartridges or other organic scavengers. Glass distilled water (even if double distilled), HPLC-grade water, and sterile water (for injections) are not adequate for ELISA. *NOTE: UltraPure water is available for purchase from Cayman (Item No. 400000).*
4. A 37°C water bath or heat block.
5. Reaction tubes.
6. Materials used for purification procedure (optional, see page 30).

## INTRODUCTION

### Background

Cyclooxygenase (COX, also called Prostaglandin H Synthase or PGHS) is a bifunctional enzyme exhibiting both COX and peroxidase activities. The COX component converts arachidonic acid to a hydroperoxy endoperoxide (PGG<sub>2</sub>), and the peroxidase component reduces the endoperoxide to the corresponding alcohol (PGH<sub>2</sub>), the precursor of PGs, thromboxanes, and prostacyclins.<sup>1,2</sup>

It is now well established that there are two distinct isoforms of COX. COX-1 is constitutively expressed in a variety of cell types and is involved in normal cellular homeostasis. A variety of stimuli, such as phorbol esters, lipopolysaccharides, and cytokines, lead to the induced expression of a second isoform of COX, COX-2. COX-2 is responsible for the biosynthesis of PGs under acute inflammatory conditions.<sup>3,4</sup> This inducible COX-2 is believed to be the target enzyme for the anti-inflammatory activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.<sup>4</sup>

### About This Assay

The COX-2 (human) Inhibitor Screening Assay directly measures PGF<sub>2α</sub> by SnCl<sub>2</sub> reduction of COX-derived PGH<sub>2</sub> produced in the COX reaction. The prostanoic product is quantified via enzyme immunoassay (ELISA) using a broadly specific antiserum that binds to all the major PG compounds.

This assay includes human recombinant COX-2 allowing the user to screen inhibitors. This assay is an excellent tool that can be used for general inhibitor screening, or to eliminate false positive leads generated by less specific methods.

### Description of AChE Competitive ELISAs<sup>5,6</sup>

This assay is based on the competition between PGs and a PG-acetylcholinesterase (AChE) conjugate (PG tracer) for a limited amount of PG antiserum. Because the concentration of the PG tracer is held constant while the concentration of PG varies, the amount of PG tracer that is able to bind to the PG antiserum will be inversely proportional to the concentration of PG in the well. This rabbit antiserum-PG (either free or tracer) complex binds to a mouse monoclonal anti-rabbit antibody that has been previously attached to the well. The plate is washed to remove any unbound reagents and then Ellman's Reagent (which contains the substrate to AChE) is added to the well. The product of this enzymatic reaction has a distinct yellow color and absorbs strongly at 412 nm. The intensity of this color, determined spectrophotometrically, is proportional to the amount of PG tracer bound to the well, which is inversely proportional to the amount of free PG present in the well during the incubation; or

$$\text{Absorbance} \propto [\text{Bound PG Tracer}] \propto 1/[\text{PG}]$$

A schematic of this process is shown in Figure 1, below.

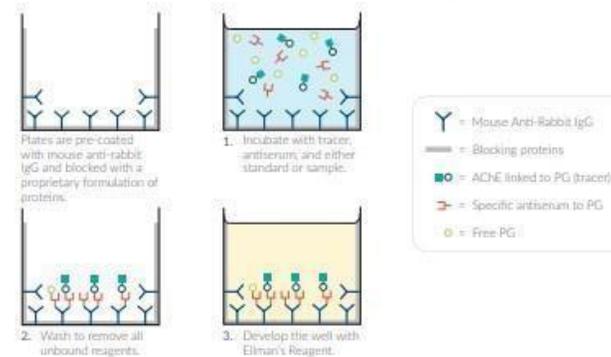


Figure 1. Schematic of the AChE ELISA

### Biochemistry of Acetylcholinesterase

The electric organ of the electric eel, *E. electricus*, contains an avid AChE capable of massive catalytic turnover during the generation of its electrochemical discharges. The electric eel AChE has a clover leaf-shaped tertiary structure consisting of a triad of tetramers attached to a collagen-like structural fibril. This stable enzyme is capable of high turnover ( $64,000 \text{ s}^{-1}$ ) for the hydrolysis of acetylthiocholine.

A molecule of the analyte covalently attached to a molecule of AChE serves as the tracer in AChE enzyme immunoassays. Quantification of the tracer is achieved by measuring its AChE activity with Ellman's Reagent. This reagent consists of acetylthiocholine and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). Hydrolysis of acetylthiocholine by AChE produces thiocholine (see Figure 2, on page 9). The non-enzymatic reaction of thiocholine with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) produces 5-thio-2-nitrobenzoic acid, which has a strong absorbance at 412 nm ( $\epsilon = 13,600$ ).

AChE has several advantages over other enzymes commonly used for enzyme immunoassays. Unlike horseradish peroxidase, AChE does not self-inactivate during turnover. This property of AChE also allows redevelopment of the assay if it is accidentally splashed or spilled. In addition, the enzyme is highly stable under the assay conditions, has a wide pH range (pH 5-10), and is not inhibited by common buffer salts or preservatives. Since AChE is stable during the development step, it is unnecessary to use a 'stop' reagent, and the plate may be read whenever it is convenient.

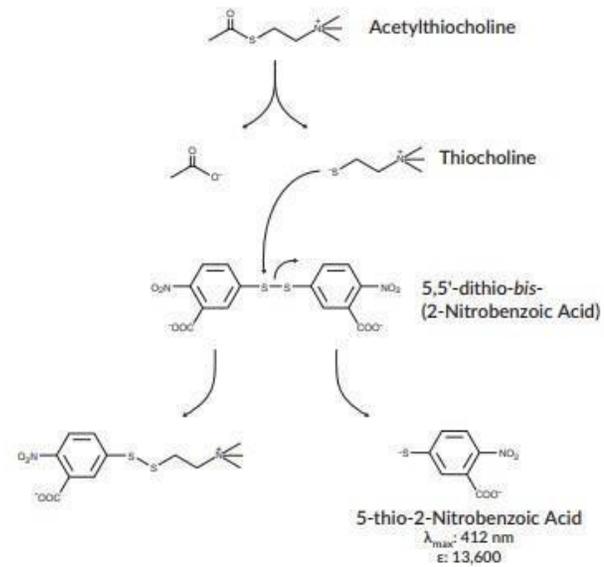


Figure 2. Reaction catalyzed by acetylcholinesterase



## COX REACTION PROCEDURE

The ELISA plate will allow for 36 COX reactions (34 inhibitors, in duplicate) at one dilution or 18 COX reactions (16 inhibitors, in duplicate) at two dilutions.

**IMPORTANT: Please read both COX Reaction Procedure and ELISA Procedure sections carefully before initiating your experiments!**

### COX Reagent Preparation

#### 1. Reaction Buffer (10X) - (Item No. 460104)

Dilute 5 ml of Reaction Buffer concentrate with 45 ml of UltraPure water. This final Reaction Buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and 2 mM phenol) is used in the COX reactions and for dilution of Heme. When stored at room temperature, this diluted Reaction Buffer is stable for at least one month. Equilibrate the diluted Reaction Buffer to 37°C before using in the COX reactions.

#### 2. COX-2 (human recombinant) - (Item No. 460121)

Each vial contains a solution of human recombinant COX-2 and should be kept on ice when thawed. Dilute 80 µl of enzyme with 320 µl of diluted Reaction Buffer and store on ice. This quantity is sufficient for 40 reactions. The diluted enzyme is stable for one hour on ice. If less than 40 reactions will be performed, it is recommended that the undiluted enzyme be aliquoted into several small vials and stored at -80°C to avoid repeated freeze thaw cycles.

#### 3. Heme - (Item No. 460102)

This vial contains a solution of Heme in dimethylsulfoxide. Dilute 40 µl of Heme with 960 µl of 1X Reaction Buffer prior to use. The diluted Heme is stable for 12 hours at room temperature.

#### 4. Arachidonic Acid (Substrate) - (Item No. 460103)

This vial contains a solution of Arachidonic Acid in ethanol. Transfer 50 µl of the supplied Substrate to another vial, add 50 µl of Potassium Hydroxide (Item No. 460105), vortex, and dilute with 400 µl of UltraPure water to achieve a final concentration of 2 mM. Use the prepared Arachidonic Acid Solution within one hour. A 10 µl aliquot of the prepared substrate will yield a final concentration of 100 µM in the reaction.

#### 5. Potassium Hydroxide - (Item No. 460105)

This vial contains 0.1 M Potassium Hydroxide. The reagent is ready to use as supplied.

#### 6. Hydrochloric Acid - (Item No. 460106)

This vial contains 1 M Hydrochloric Acid (HCl). The HCl is used to prepare the saturated Stannous Chloride Solution.

#### 7. Stannous Chloride - (Item No. 460107)

This vial contains crystalline Stannous Chloride. Add 5 ml of Hydrochloric Acid (Item No. 460106) and vortex to produce a saturated solution of Stannous Chloride. (This saturated Stannous Chloride Solution may be cloudy.) This solution is stable for eight hours at room temperature. If not performing all of the COX reactions in one day, weigh 125 mg of Stannous Chloride into another vial and add 2.5 ml of Hydrochloric Acid (Item No. 460106). 30 µl of saturated Stannous Chloride is required for each reaction. *NOTE: Stannous Chloride is used to reduce PGH<sub>2</sub>, produced in the COX reaction, to a more stable PG, PGF<sub>2d</sub>*



## Performing COX Reactions

### Pipetting Hints

- It is recommended that a repeating or multichannel pipettor be used to deliver Arachidonic Acid to the reaction tubes. This saves time and helps to maintain more precise incubation times.
  - Use different tips to pipette the buffer, enzyme, Heme, inhibitor, and Arachidonic Acid (substrate).
  - Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (*i.e.*, slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
  - Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the reaction tube.
- 
- The final volume of the reaction is 230  $\mu$ l in all the reaction tubes.
  - The ELISA plate will allow for 36 COX reactions (34 inhibitors, in duplicate) at one dilution or 18 COX reactions (16 inhibitors, in duplicate) at two dilutions.
  - Use the 1X Reaction Buffer in the reactions and pre-equilibrate to 37°C.
  - Set the water bath or heat block temperature to 37°C before initiating the reactions.
  - It is recommended that no more than 18 reactions be performed at one time.
  - Aliquot reagents into reaction tubes that are at 37°C.

1. **Background tubes** - Inactivate COX-2 by transferring 20  $\mu$ l of diluted enzyme to a 500  $\mu$ l microfuge tube and placing the tube in boiling water for three minutes. The inactivated enzymes will be used to generate the background values. Add the following reagents to two reaction tubes: 160  $\mu$ l of Reaction Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, and 10  $\mu$ l of inactive COX-2.
2. **COX-2 100% Initial Activity tubes** - add 160  $\mu$ l of Reaction Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, and 10  $\mu$ l of COX-2 to two reaction tubes.
3. **COX-2 Inhibitor tubes** - add 160  $\mu$ l of Reaction Buffer, 10  $\mu$ l of Heme, and 10  $\mu$ l of COX-2 to six reaction tubes.
4. Add 10  $\mu$ l of inhibitor\* to the COX-2 inhibitor tubes and 10  $\mu$ l of inhibitor vehicle to the 100% Initial Activity and Background tubes.
5. Incubate for 10 minutes at 37°C. *NOTE: Most inhibitors exhibit time-dependent inhibition of COX activity. Altering incubation times with the inhibitor can significantly change the apparent  $IC_{50}$  value of the compound. Determining the optimal pre-incubation times for inhibitors is suggested.*
6. Initiate the reaction by adding 10  $\mu$ l of Arachidonic Acid (substrate) to all the reaction tubes. Quickly mix and incubate for EXACTLY two minutes at 37°C.
7. Add 30  $\mu$ l of the saturated Stannous Chloride solution to each reaction tube to stop enzyme catalysis. Remove tubes from the water bath and vortex. Incubate for five minutes at room temperature. The reaction mixture will be cloudy.
8. Repeat steps 2-8 if performing more reactions.
9. The PGs are quantified by ELISA. Proceed to the **ELISA Procedure**. The reactions are stable for one week at 0-4°C if tightly capped.

\*Inhibitors can be dissolved in methanol, dimethylsulfoxide, or ethanol and should be added to the assay in a final volume of 10  $\mu$ l. In the event that the appropriate concentration of inhibitor is completely unknown, we recommend that several dilutions of the inhibitor be made.

## ELISA PROCEDURE

**NOTE:** Water used to prepare all ELISA reagents and buffers must be deionized and free of trace organic contaminants ("UltraPure"). Use activated carbon filter cartridges or other organic scavengers. Glass distilled water (even if double distilled), HPLC-grade water, and sterile water (for injections) are not adequate for ELISA. UltraPure water may be purchased from Cayman (Item No. 400000).

### ELISA Buffer Preparation

Store all diluted buffers at 4°C; they will be stable for about two months.

#### 1. ELISA Buffer Preparation

Dilute the contents of one vial of ELISA Buffer Concentrate (10X) (Item No. 400060) with 90 ml of UltraPure water. Be certain to rinse the vial to remove any salts that may have precipitated. **NOTE:** It is normal for the concentrated buffer to contain crystalline salts after thawing. These will completely dissolve upon dilution with water.

#### 2. Wash Buffer Preparation

Dilute the contents of the vial of Wash Buffer Concentrate (400X) (Item No. 400062) to a total volume of 2 liters with UltraPure water and add 1 ml of Polysorbate 20 (Item No. 400035). A smaller volume of Wash Buffer can be prepared by diluting the Wash Buffer Concentrate 1:400 and adding Polysorbate 20 (0.5 ml/L of Wash Buffer). The diluted buffer will be stable for two months at 4°C.

**NOTE:** Polysorbate 20 is a viscous liquid and cannot be measured by a pipette. A positive displacement device such as a syringe should be used to deliver small quantities accurately.

## Preparation of Assay-Specific Reagents

### Prostaglandin Screening Standard

Dissolve the lyophilized PG Screening ELISA Standard (Item No. 414026) in 1 ml of ELISA Buffer. The concentration of this solution (the bulk standard) will be 10 ng/ml. Store this solution at 4°C; it will be stable for approximately six weeks.

To prepare the standard for use in ELISA: Obtain eight clean test tubes and number them #1 through #8. Aliquot 800 µl ELISA Buffer to tube #1 and 500 µl ELISA Buffer to tubes #2-8. Transfer 200 µl of the bulk standard (10 ng/ml) to tube #1 and mix thoroughly. Serially dilute the standard by removing 500 µl from tube #1 and placing in tube #2; mix thoroughly. Next, remove 500 µl from tube #2 and place into tube #3; mix thoroughly. Repeat this process for tubes #4-8. These diluted standards should not be stored for more than 24 hours.

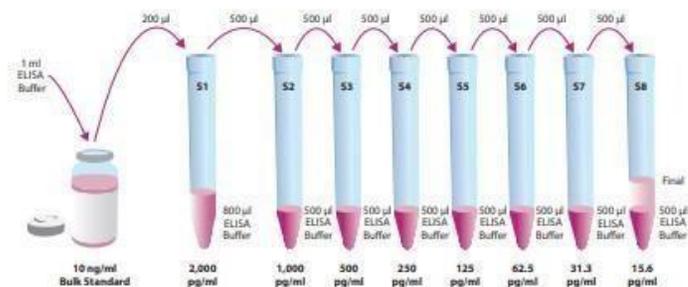


Figure 3. Preparation of the PG standards



### Prostaglandin Screening AChE Tracer

Reconstitute the 100 dtn PG Screening AChE Tracer (Item No. 414006) with 6 ml ELISA Buffer. Store the reconstituted PG Screening AChE Tracer at 4°C (*do not freeze!*) and use within two weeks. A 20% surplus of tracer has been included to account for any incidental losses.

### Prostaglandin Screening ELISA Antiserum

Reconstitute the 100 dtn PG Screening ELISA Antiserum (Item No. 414016) with 6 ml ELISA Buffer. Store the reconstituted PG Screening ELISA Antiserum at 4°C. It will be stable for at least four weeks. A 20% surplus of antiserum has been included to account for any incidental losses.

### COX Reaction Dilutions

#### Background Samples

In a clean test tube labeled BC, add 990  $\mu$ l of ELISA Buffer. Add 10  $\mu$ l of background COX-2 to the tube labeled BC, and mix thoroughly. This test tube contains a 1:100 dilution of the original sample.

#### COX 100% Initial Activity Samples

Obtain three clean test tubes per sample and number them IA1 through IA3. Aliquot 990  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube IA1, add 10  $\mu$ l of COX-2 100% Initial Activity sample, and mix thoroughly. Aliquot 950  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube IA2, add 50  $\mu$ l of tube IA1 to tube IA2, and mix thoroughly. Tube IA2 contains a 1:2,000 dilution of the original sample. Aliquot 500  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube IA3, add 500  $\mu$ l of tube IA2 to tube IA3, and mix thoroughly. Tube IA3 contains a 1:4,000 dilution of the original sample. Tubes IA2 and IA3 will be run in the ELISA. Do not use test tube IA1 in the ELISA, this tube is too concentrated (this dilution is outside the usable range of the assay).

#### COX Inhibitor Samples

Obtain three clean test tubes per sample and number them C1 through C3. Aliquot 990  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube C1, add 10  $\mu$ l of sample, and mix thoroughly. Aliquot 950  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube C2, add 50  $\mu$ l of tube C1 to tube C2, and mix thoroughly. Tube C2 contains a 1:2,000 dilution of the original sample. Aliquot 500  $\mu$ l of ELISA Buffer to tube C3, add 500  $\mu$ l of tube C2 to tube C3, and mix thoroughly. Tube C3 contains a 1:4,000 dilution of the original sample. Tubes C2 and C3 will be run in the ELISA. Do not use test tube C1 in the ELISA, this tube is too concentrated (this dilution is outside the usable range of the assay).

## Definition of Key Terms

**Blank:** background absorbance caused by Ellman's Reagent. The blank absorbance should be subtracted from the absorbance readings of all the other wells, including NSB wells.

**Total Activity:** total enzymatic activity of the AChE-linked tracer. This is analogous to the specific activity of a radioactive tracer.

**NSB (Non-Specific Binding):** non-immunological binding of the tracer to the well. Even in the absence of specific antibody a very small amount of tracer still binds to the well; the NSB is a measure of this low binding. Do not forget to subtract the Blank absorbance values.

**B<sub>0</sub> (Maximum Binding):** maximum amount of the tracer that the antibody can bind in the absence of free analyte.

**%B/B<sub>0</sub> (%Bound/Maximum Bound):** ratio of the absorbance of a particular sample or standard well to that of the maximum binding (B<sub>0</sub>) well.

**Standard Curve:** a plot of the %B/B<sub>0</sub> values versus concentration of a series of wells containing various known amounts of analyte.

**Dtn:** determination, where one dtn is the amount of reagent used per well.

**Cross Reactivity:** numerical representation of the relative reactivity of this assay towards structurally related molecules as compared to the primary analyte of interest. Biomolecules that possess similar epitopes to the analyte can compete with the assay tracer for binding to the primary antibody. Substances that are superior to the analyte in displacing the tracer result in a cross reactivity that is greater than 100%. Substances that are inferior to the primary analyte in displacing the tracer result in a cross reactivity that is less than 100%. Cross reactivity is calculated by comparing the mid-point (50% B/B<sub>0</sub>) value of the tested molecule to the mid-point (50% B/B<sub>0</sub>) value of the primary analyte when each is measured in assay buffer using the following formula:

$$\% \text{ Cross Reactivity} = \left[ \frac{50\% \text{ B/B}_0 \text{ value for the primary analyte}}{50\% \text{ B/B}_0 \text{ value for the potential cross reactant}} \right] \times 100\%$$

## Plate Set Up

The 96-well plate(s) included with this kit is supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate(s) prior to adding the reagents. *NOTE: If you do not need to use all the strips at once, place the unused strips back in the plate packet and store at 4°C. Be sure the packet is sealed with the desiccant inside.*

Each plate or set of strips must contain a minimum of two Blanks (Blk), two Non-Specific Binding wells (NSB), two Maximum Binding wells (B<sub>0</sub>), one Total Activity well (TA), and an eight point standard curve run in duplicate. *NOTE: Each assay must contain this minimum configuration in order to ensure accurate and reproducible results.* Each COX reaction sample should be assayed at two dilutions and each dilution should be assayed in duplicate. A minimum of one 100% Initial Activity Sample should be assayed for COX-2.

A suggested plate format is shown in Figure 4, below. The user may vary the location and type of wells present as necessary for each particular experiment. The plate format provided below has been designed to allow for easy data analysis using a convenient spreadsheet offered by Cayman (see page 23, for more details). We suggest you record the contents of each well on the template sheet provided (see page 34).

Blk - Blank  
 TA - Total Activity  
 NSB - Non-Specific Binding  
 B<sub>0</sub> - Maximum Binding  
 S1-S8 - Standards 1-8  
 BC - Background COX-2  
 ‡ - 100% Initial Activity Samples (IA2 & IA3)  
 H - COX Inhibitor Samples (C2 & C3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	BC	BC	H	H	H	H	H	H	H
B	Blk	S2	S2	‡	‡	H	H	H	H	H	H	H
C	NSB	S3	S3	‡	‡	H	H	H	H	H	H	H
D	NSB	S4	S4	H	H	H	H	H	H	H	H	H
E	B <sub>0</sub>	S5	S5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
F	B <sub>0</sub>	S6	S6	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G	B <sub>0</sub>	S7	S7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	TA	S8	S8	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Figure 4. Sample plate format

## Performing the ELISA

### Pipetting Hints

- Use different tips to pipette each reagent.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (*i.e.*, slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
- Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the well.

### Addition of the Reagents

#### 1. ELISA Buffer

Add 100  $\mu\text{l}$  of ELISA Buffer to NSB wells. Add 50  $\mu\text{l}$  of ELISA Buffer to B<sub>0</sub> wells.

#### 2. Prostaglandin Screening ELISA Standard

Add 50  $\mu\text{l}$  from tube #8 to both of the lowest standard wells (S8). Add 50  $\mu\text{l}$  from tube #7 to each of the next two standard wells (S7). Continue with this procedure until all the standards are aliquoted. The same pipette tip should be used to aliquot all the standards. Before pipetting each standard, be sure to equilibrate the pipette tip in that standard.

#### 3. Background Samples (test tube BC)

Add 50  $\mu\text{l}$  of sample per well. Each sample should be assayed in duplicate.

#### 4. COX 100% Initial Activity Samples (test tubes IA2 and IA3)

Add 50  $\mu\text{l}$  of sample per well. We recommend that you assay each sample at the two dilutions with each dilution assayed in duplicate.

#### 5. COX Inhibitor Samples (test tubes C2 and C3)

Add 50  $\mu\text{l}$  of sample per well. We recommend that you assay each sample at the two dilutions with each dilution assayed in duplicate.

#### 6. Prostaglandin Screening AChE Tracer

Add 50  $\mu\text{l}$  of PG Screening AChE Tracer to each well *except* the TA and the Blk wells.

#### 7. Prostaglandin Screening ELISA Antiserum

Add 50  $\mu\text{l}$  of PG Screening ELISA Antiserum to each well *except* the TA, the NSB, and the Blk wells.

Well	ELISA Buffer	Standard/Sample	Tracer	Antiserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 $\mu\text{l}$ (at devl. step)	-
NSB	100 $\mu\text{l}$	-	50 $\mu\text{l}$	-
B <sub>0</sub>	50 $\mu\text{l}$	-	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Std/Sample	-	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

**Table 1. Pipetting summary**

### Incubation of the Plate

Cover each plate with plastic film (Item No. 400012) and incubate for 18 hours at room temperature on an orbital shaker.

### Development of the Plate

1. When ready to develop the plate, reconstitute one 100 dtn vial of Ellman's Reagent (Item No. 400050) with 20 ml of UltraPure water. This reagent is sufficient to develop 100 wells.

*NOTE: Reconstituted Ellman's Reagent is unstable and should be used the same day it is prepared; protect the Ellman's Reagent from light when not in use. Extra vials of the reagent have been provided should a plate need to be re-developed or multiple assays run on different days.*



2. Empty the wells and rinse five times with Wash Buffer.
3. Add 200  $\mu$ l of Ellman's Reagent to each well.
4. Add 5  $\mu$ l of tracer to the TA wells.
5. Cover the plate with plastic film. Optimum development is obtained by using an **orbital shaker** equipped with a large, flat cover to allow the plate to develop in the dark. This assay typically develops (i.e.,  $B_0$  wells  $\geq 0.3$  A.U. (blank subtracted)) in **60-90 minutes**.

#### Reading the Plate

1. Wipe the bottom of the plate with a clean tissue to remove fingerprints, dirt, etc.
2. Remove the plate cover being careful to keep Ellman's Reagent from splashing on the cover. *NOTE: Any loss of Ellman's Reagent will affect the absorbance readings. If Ellman's Reagent is present on the cover, use a pipette to transfer the Ellman's Reagent into the well. If too much Ellman's Reagent has splashed on the cover to easily redistribute back into the wells, wash the plate three times with wash buffer and repeat the development with fresh Ellman's Reagent.*
3. Read the plate at a wavelength between 405 and 420 nm. The absorbance may be checked periodically until the  $B_0$  wells have reached a minimum of 0.3 A.U. (blank subtracted). The plate should be read when the absorbance of the  $B_0$  wells are in the range of 0.3-0.8 A.U. (blank subtracted). If the absorbance of the wells exceeds 1.5, wash the plate, add fresh Ellman's Reagent and let it develop again.

## ANALYSIS

Many plate readers come with data reduction software that plot data automatically. Alternatively a spreadsheet program can be used. The data should be plotted as  $\%B/B_0$  versus log concentration using either a 4-parameter logistic or log-logit curve fit. *NOTE: Cayman has a computer spreadsheet available for data analysis. Please contact Technical Service or visit our website ([www.caymanchem.com/analysis/elisa](http://www.caymanchem.com/analysis/elisa)) to obtain a free copy of this convenient data analysis tool.*

### Calculations

#### Preparation of the Data

The following procedure is recommended for preparation of the data prior to graphical analysis.

*NOTE: If the plate reader has not subtracted the absorbance readings of the blank wells from the absorbance readings of the rest of the plate, be sure to do that now.*

1. Average the absorbance readings from the NSB wells.
2. Average the absorbance readings from the  $B_0$  wells.
3. Subtract the NSB average from the  $B_0$  average. This is the corrected  $B_0$  or corrected maximum binding.
4. Calculate the  $\%B/B_0$  (% Sample or Standard Bound/Maximum Bound) for the remaining wells. To do this, subtract the average NSB absorbance from the S1 absorbance and divide by the corrected  $B_0$  (from Step 3). Multiply by 100 to obtain  $\%B/B_0$ . Repeat for S2-S8 and all sample wells.

*NOTE: The TA values are not used in the standard curve calculations. Rather, they are used as a diagnostic tool; the corrected  $B_0$  divided by the actual TA (10X measured absorbance) will give the %Bound. This value should closely approximate the %Bound that can be calculated from the Sample Data (see page 26). Erratic absorbance values and a low (or no) %Bound could indicate the presence of organic solvents in the buffer or other technical problems (see page 32 for Troubleshooting).*



If you have purified your samples (see *Interference*, page 30), the final sample concentrations can be determined as follows:

#### Calculations

$$\text{Recovery Factor} = \frac{10 \times \text{cpm of sample}}{[^3\text{H}]\text{-PGE}_2 \text{ added to sample (cpm)}}$$

$$\text{PG (pg) in purified sample} = \left[ \frac{\text{Value from EIA (pg/ml)}}{\text{Recovery Factor}} \right] \times 0.5 \text{ ml - added } [^3\text{H}]\text{-PGE}_2 \text{ (pg)}$$

$$\text{Total PG in sample (pg/ml)} = \frac{\text{PG (pg) in purified sample}}{\text{Volume of sample used for purification (ml)}}$$

#### Plot the Standard Curve

Plot %B/B<sub>0</sub> for standards S1-S8 versus Prostaglandin concentration using linear (y) and log (x) axes and perform a 4-parameter logistic fit.

Alternative Plot - The data can also be linearized using a logit transformation. The equation for this conversion is shown below. *NOTE: Do not use %B/B<sub>0</sub> in this calculation.*

$$\text{logit (B/B}_0) = \ln [B/B_0 / (1 - B/B_0)]$$

Plot the data as logit (B/B<sub>0</sub>) versus log concentrations and perform a linear regression fit.

#### Determine the Sample Concentration

1. Calculate the %B/B<sub>0</sub> value for each sample.
2. Determine the concentration of each sample by identifying the %B/B<sub>0</sub> on the standard curve and reading the corresponding values on the x-axis. %B/B<sub>0</sub> values greater than 80% and less than 20% should be re-assayed as they generally fall out of the linear range of the standard curve. A 20% or greater disparity between the apparent concentration of two different dilutions of the same sample could indicate interference which may be eliminated by purification. Remember to multiply the COX samples by the appropriate dilution factor (BC = 100; IA2 and C2 = 2,000; IA3 and C3 = 4,000).
3. Subtract the background values (BC) from the 100% Initial Activity and COX Inhibitor samples.
4. Subtract each Inhibitor Sample from the 100% Initial Activity Sample, then divide by the 100% Initial Activity Sample, and multiply by 100 to give the percent inhibition.
5. Graph the percent inhibition by the inhibitor concentration to determine the IC<sub>50</sub> value (concentration at which there was 50% inhibition).

### ELISA Performance Characteristics

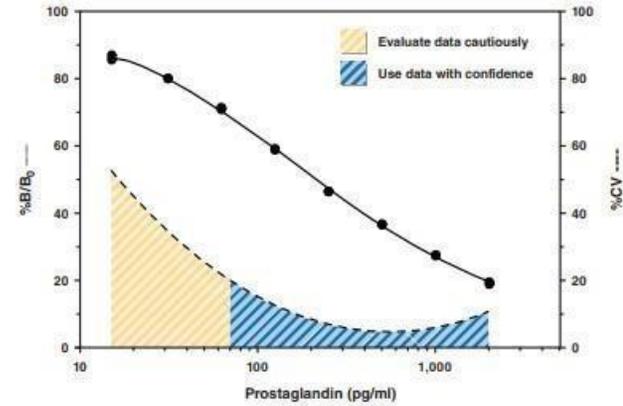
#### Sample Data

The standard curve presented here is an example of the data typically produced with this kit; however, your results will not be identical to these. You **must** run a new standard curve. Do not use the data below to determine the value of your samples. Your results could differ substantially.

	Raw Data		Average	Corrected
Total Activity	1.850	2.019	1.935	
NSB	0.003	0.002	0.003	
$B_0$	0.779	0.766		
	0.771	0.778	0.774	0.771

Dose (pg/ml)	Raw Data		Corrected		%B/ $B_0$	
2,000	0.148	0.153	0.145	0.150	18.9	19.5
1,000	0.214	0.215	0.211	0.212	27.4	27.6
500	0.286	0.285	0.283	0.282	36.8	36.6
250	0.362	0.361	0.359	0.358	46.6	46.5
125	0.457	0.459	0.454	0.456	58.9	59.2
62.5	0.554	0.550	0.551	0.547	71.5	71.0
31.3	0.620	0.621	0.617	0.618	80.1	80.2
15.6	0.664	0.674	0.661	0.671	85.8	87.1

Table 2. Typical results



Assay Range = 15.6-2,000 pg/ml  
 Sensitivity (defined as 80% B/ $B_0$ ) = 29 pg/ml  
 Mid-point (defined as 50% B/ $B_0$ ) = 125-250 pg/ml  
 The sensitivity and mid-point were derived from the standard curve shown above. The standard was diluted with ELISA Buffer.

Figure 5. Typical standard curve

**Precision:**

The intra- and inter-assay CVs have been determined at multiple points on the standard curve. These data are summarized in the graph on page 27 and in the table below.

Dose (pg/ml)	%CV*	
	Intra-assay variation	Inter-assay variation
2,000	7.9	13.1
1,000	8.1	9.8
500	8.2	6.8
250	8.6	9.7
125	10.6	10.2
62.5	11.0	8.8
31.3	†	19.4
15.6	†	†

**Table 3. Intra- and inter-assay variation**

\*%CV represents the variation in concentration (not absorbance) as determined using a reference standard curve.

†Outside of the recommended usable range of the assay.

**Cross Reactivity:**

Compound	Cross Reactivity	Compound	Cross Reactivity
Prostaglandin E <sub>1</sub>	100%	Leukotriene D <sub>4</sub>	0.2%
Prostaglandin E <sub>2</sub>	100%	Arachidonic Acid	<0.01%
Prostaglandin F <sub>1α</sub>	100%	Leukotriene B <sub>4</sub>	<0.01%
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	100%	Leukotriene C <sub>4</sub>	<0.01%
Prostaglandin F <sub>3α</sub>	51.3%	Leukotriene E <sub>4</sub>	<0.01%
Prostaglandin E <sub>2</sub> Ethanolamide	44.0%	Misoprostol	<0.01%
6-keto Prostaglandin F <sub>1α</sub>	43.6%	Misoprostol (free acid)	<0.01%
8-iso Prostaglandin F <sub>2α</sub>	38.4%	Prostaglandin A <sub>1</sub>	<0.01%
8-iso Prostaglandin E <sub>2</sub>	28.5%	Prostaglandin A <sub>2</sub>	<0.01%
Prostaglandin D <sub>2</sub>	26.6%	Prostaglandin A <sub>3</sub>	<0.01%
8-iso-2,3-dinor Prostaglandin F <sub>1α</sub>	20.0%	Prostaglandin B <sub>1</sub>	<0.01%
Prostaglandin E <sub>3</sub>	9.5%	15-keto Prostaglandin E <sub>2</sub>	<0.01%
Thromboxane B <sub>2</sub>	5.0%	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F <sub>2α</sub>	<0.01%
12(S)-HHTrE	0.25%		

**Table 4. Cross Reactivity of the PG Screening Assay**



## RESOURCES

### Interference

It is possible that a COX inhibitor will interfere with the ELISA and thus appear to exhibit no enzyme inhibition or exhibit a higher prostaglandin value than the 100% initial activity well. If the inhibitor exhibits no inhibition, you can either repeat the COX reaction using a higher concentration of inhibitor or purify the sample and repeat the ELISA. If the sample exhibits a higher PG value than the 100% initial activity well, purify the sample and repeat the ELISA. You can also test for inhibitor interference by adding the inhibitor to a boiled enzyme sample as a control. Treat the control as a normal COX Inhibitor Sample. The sample should not yield any PGs. If the inhibitor is detected by the antiserum, the inhibitor is interfering with the ELISA.

To standardize the assay with specific COX-2 inhibitors, use DuP697 (Item No. 70645). At a final concentration of 5 nM DuP-697 in the COX-2 reactions, these inhibitors will yield approximately 50% inhibition.

### Sample purification procedure to be followed only if an inhibitor is interfering with the assay:

1. Add 10,000 cpm of radiolabeled PGE<sub>2</sub> (<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>) to the sample. We recommend that a high specific activity tracer be used in order to minimize the amount of radioactive PGE<sub>2</sub> added. The ELISA will be able to detect the added PGE<sub>2</sub> and therefore the amount added should be insignificant in comparison to the endogenous analyte, yet should be sufficient for accurate scintillation counting.
2. Adjust the pH of the sample to ~4.0 using 1.0 M acetate buffer or citrate buffer (pH 4.0). (Standardize the pH adjustment using the sample matrix prior to proceeding with a large number of samples; approximately 1-2 equivalents of buffer is required for most biological samples.) If the samples are cloudy or contain precipitate, either filter or centrifuge to remove the precipitate. Particulate matter in the sample may clog the SPE (solid phase extraction) cartridge, resulting in loss of the sample.
3. Activate a SPE Cartridge (C-18) (6 ml) (Item No. 400020) by rinsing with 5 ml methanol and then with 5 ml UltraPure water. Do not allow the SPE cartridge to dry. *NOTE: Use one cartridge per sample.*
4. Pass the sample through the SPE cartridge. Rinse the cartridge with 5 ml UltraPure water. Discard the washes. Elute the PGE<sub>2</sub> with 5 ml ethyl acetate containing 1% methanol. Higher recovery and better reproducibility may be obtained if the sample is applied and eluted by gravity. The wash steps may be performed under vacuum or pressure.
5. Remove 500 µl for scintillation counting.
6. Evaporate the ethyl acetate/methanol to dryness either by vacuum centrifugation or by evaporation under a stream of dry nitrogen. It is imperative that all of the organic solvent is removed, as even trace quantities will adversely affect the ELISA.
7. Add 1.035 ml of ELISA Buffer and vortex. Proceed to COX Reaction Dilutions (see page 17) for the sample dilutions.



## Troubleshooting

Problem	Possible Causes	Recommended Solutions
Erratic values; dispersion of duplicates	A. Trace organic contaminants in the water source B. Poor pipetting/technique	Replace activated carbon filter or change source of UltraPure water
High NSB (>10% of B <sub>0</sub> )	A. Poor washing B. Exposure of NSB wells to specific antibody	Rewash plate and redevelop
Very low B <sub>0</sub>	A. Trace organic contaminants in the water source B. Plate requires additional development time C. Dilution error in preparing reagents	A. Replace activated carbon filter or change source of UltraPure water B. Return plate to shaker and re-read later
Low sensitivity (shift in dose response curve)	Standard is degraded	Replace standard
Analyses of two dilutions do not agree (i.e., more than 20% difference)	Interfering substances are present	See Interference section on page 30
Only Total Activity (TA) wells develop	Trace organic contaminants in the water source	Replace activated carbon filter or change source of UltraPure water
No inhibition seen with compound	A. The concentration of the compound is not high enough B. The compound is not an inhibitor of the enzyme	Increase the compound concentration and re-assay

## Additional Reading

Go to [www.caymanchem.com/560131/references](http://www.caymanchem.com/560131/references) for a list of publications citing the use of Cayman's COX Inhibitor Screening Assay Kit.

## References

1. Nugteren, D.H. and Hazelhof, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 448-461 (1973).
2. Hamberg, M. and Samuelsson, B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 899-903 (1973).
3. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2692-2696 (1991).
4. Blobaum, A.L. and Marnett, L.J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J. Med. Chem.* **50(7)**, 1425-1441 (2007).
5. Maclouf, J., Grassi, J., and Pradelles, P. Development of enzyme-immunoassay techniques for the measurement of eicosanoids, Chapter 5, in *Prostaglandin and Lipid Metabolism in Radiation Injury*. Walden, T.L., Jr. and Hughes, H.N., editors, Plenum Press, Rockville, 355-364 (1987).
6. Pradelles, P., Grassi, J., and Maclouf, J.A. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.* **57**, 1170-1173 (1985).



12									
11									
10									
9									
8									
7									
6									
5									
4									
3									
2									
1									
	A	B	C	D	E	F	G	H	

NOTES

**Warranty and Limitation of Remedy**

Buyer agrees to purchase the material subject to Cayman's Terms and Conditions. Complete Terms and Conditions including Warranty and Limitation of Liability information can be found on our website.

This document is copyrighted. All rights are reserved. This document may not, in whole or part, be copied, photocopied, reproduced, translated, or reduced to any electronic medium or machine-readable form without prior consent, in writing, from Cayman Chemical Company.

©08/03/2016, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, All rights reserved. Printed in U.S.A.