

ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPONJAS MARINAS *XESTOSPONGIA ROSARIENSIS* Y *X. PROXIMA* UTILIZANDO LOS MODELOS EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA Y POLIMORFONUCLEAR NEUTRÓFILO

PRELIMINARY ANTIINFLAMMATORY ACTION OF MARINE SPONGES *XESTOSPONGIA ROSARIENSIS* AND *X. PROXIMA* EXTRACTS USING THE MODELS CARRAGEENAN-INDUCED PAW EDEMA AND POLIMORFONUCLEAR NEUTROPHIL

Ricardo Gaitán-Ibarra^{1,2}, Marlene Durán-Lengua^{1,3}, Luis Franco-Ospina^{1,4}

Resumen

Los extractos totales de las esponjas marinas del género *Xestospongia proxima* y *X. rosariensis* fueron evaluados como antiinflamatorios, presentando una significativa actividad *in vivo* en el modelo del edema plantar en ratas inducido por carragenina. También se analizó la inhibición de la liberación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y la actividad catalítica de la elastasa de neutrófilos humanos (ENH). Algunos extractos de *Xestospongia rosariensis* disminuyeron la liberación de MPO a concentraciones de 5,0, 10,0 y 25,0 µg/ml. Además, extractos de hexano y diclorometano inhibieron la elastasa a concentraciones de 10,0 y 25,0 µg/ml.

Palabras clave: actividad antiinflamatoria, *Xestospongia rosariensis*, *Xestospongia proxima*, polimorfonuclear neutrófilo, mieloperoxidasa, elastasa.

Abstract

The total extracts of marine sponges *Xestospongia proxima* and *Xestospongia rosariensis* were evaluated as antiinflammatorial; showing a significant activity in carrageenan-induced paw edema in rats. Also, was analyzed the inhibition of the liberation of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and the catalytic activity of the elastase (ENH). Some extracts of *Xestospongia rosariensis* at 5.0, 10.0, and 25.0 µg/ml decreased the liberation of MPO. In addition, at 10 and 25 µg/ml hexane and dicloromethane extracts inhibited elastase.

Key words: anti-inflammatory activity, *Xestospongia rosariensis*, *Xestospongia proxima*, polymorphonuclear neutrophil, myeloperoxidase, elastase.

INTRODUCCIÓN

El proceso inflamatorio es uno de los principales componentes del mecanismo de defensa inmune, por lo tanto es un proceso normal en el organismo. Sin embargo, algunas veces se manifiesta o se prolonga innecesariamente, causando daño en los tejidos con efectos clínicos importantes. (Dugal et al., 1994).

Las enfermedades inflamatorias son tratadas, con diversidad de fármacos, incluyendo terapias antiselectinas, antiintegrinas, bloqueadores de citocinas,

análogos del lípido A, análogos esteroides y no esteroides (AINES); algunos de estos producen alteraciones fisiopatológicas a nivel gastrointestinal, renal y plaquetario, entre otras, ocasionando graves patologías al individuo (Wolfe et al., 1999). Muchas de estas patologías se caracterizan por niveles elevados de enzimas mieloperoxidasa (MPO) y elastasa. La primera genera radicales libres y ácido hipocloroso, un potente bactericida y la elastasa al encontrarse en niveles elevados actúa sobre el colágeno, elastina y otras proteínas, ocasionando daño y prolongando el proceso inflamatorio (García et al., 1998).

¹ Grupo de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Cartagena, *Campus de Zaragocilla*-Cartagena (Bolívar), Colombia.

Correos electrónicos: ² <rigaitan2003@yahoo.es>; ³ <marlene_duran@epm.net.co>; ⁴ <correofrancos@yahoo.com>.

En la búsqueda de compuestos con actividad biológica, las esponjas marinas han dejado entrever su actividad antiinflamatoria; por ejemplo, de *Lufariella variabilis* fueron aislados manoalide y lufariellolide, que tienen potente actividad antiinflamatoria, a través de la inhibición de la fosfolipasa A₂. El primer producto es un inhibidor irreversible de la enzima fosfolipasa A₂, mientras que el segundo es un inhibidor reversible de la misma enzima (Kernan et al., 1989).

El género *Xestospongia* es abundante en nuestro mar Caribe y muy poco estudiado como fuente de metabolitos con potencial terapéutico. En este trabajo por tanto se evaluó la posible actividad antiinflamatoria de los extractos de la esponjas marinas *Xestospongia rosariensis* y *Xestospongia proxima* en el modelo de edema plantar (Sugishita et al., 1981) y corroborar esta actividad y su posible mecanismo de acción como inhibidores de la liberación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y de la actividad catalítica de la elastasa de neutrófilos humanos (ENH) utilizando el modelo polimorfonuclear neutrófilo (PMN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de los extractos de esponjas marinas. La esponja *X. rosariensis* fue recolectada en las Islas del Rosario (Bolívar), Colombia, a profundidades entre 4-20 m; *X. proxima* fue recolectada en Punta Betín, Bahía de Santa Marta (Magdalena), Colombia, a profundidades de 18-20 m. Los especímenes fueron identificados por el Prof. Dr. Sven Zea, de la Universidad Nacional de Colombia.

El material animal se transportó al laboratorio en condiciones de baja temperatura, una vez allí fue lavado con agua destilada, picado y sometido a liofilización. El material liofilizado fue pulverizado y homogenizado con metanol a temperatura ambiente, durante un día. La solución en metanol fue filtrada y concentrada a presión reducida, obteniéndose

una suspensión acuosa de color pardo, que constituyó el extracto metanólico total (EMT), una parte se diluyó en H₂O y se sometió a partición en hexano (400 ml x 3, EH) y diclorometano (400 ml x 3, ED). El remanente sin extraer constituyó la solución metanólico parcial. Todas las soluciones fueron concentradas a presión reducida, obteniéndose los correspondientes extractos EMT, EH, ED y EMP respectivamente. Para el ensayo in vivo las dosis fueron expresadas en mg de extracto seco / kilogramo de peso corporal y para el ensayo PMN se utilizaron concentraciones de 0.5, 1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml.

Actividad antiinflamatoria in vivo. Se utilizaron ratas *Wistar* con peso comprendido entre 140-170 g, divididas en grupos de cinco animales por cada grupo de estudio y mantenidos en un ambiente a temperatura controlada con agua y alimentación *ad libitum*.

Edema plantar inducido por carragenina. La actividad antiinflamatoria fue realizada según el método de Winter modificado (Sugishita et al., 1981). El edema inducido por la inyección de 0.05 ml de una pseudosolución de 2% P/V de l-carragenina en solución salina, en la región subplantar de la pata trasera derecha. Medimos el volumen de la pata de cada rata antes y 5 horas después de la inyección, utilizando para ello un pletismómetro 7140. Los grupos de estudio fueron tratados con los extractos a dosis de 100 mg/k de peso, utilizando la vía intraperitoneal (i.p), suspendiendo cada extracto en carboximetil celulosa (CMC) al 5%. Una hora antes de suministrar la l-carragenina y como control positivo un grupo recibió 10 mg/k de fenilbutazona vía i.p. suspendida en CMC, otro grupo recibió sólo el vehículo.

Los valores de inflamación e inhibición de la misma, fueron calculados para cada grupo según la expresión matemática

$$\text{Edema} = \frac{V_t - V_0}{V_0} * 100 \quad \text{Inhibición} = \frac{E_c - E_t}{E_c} * 100$$

Donde V_t es el volumen 5 horas después de la inyección de l-carragenina. V_0 es el volumen de la pata sin tratar. E_c es la inflamación del grupo control. E_t es la inflamación del grupo tratado.

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de los valores de inflamación. Las diferencias entre los controles y los grupos tratados con criterios de significancia de $p < 0,05$ (tabla 1).

Tabla 1. Referencias de efectos de drogas y extractos sobre el edema plantar inducido por carragenina

Grupo	Dosis (mg/kg)	Edema (%)	Inhibición (%)
Control		73,24 \pm 3,13	
Fenilbutazona	10	31,01 \pm 3,28 ^a	57,66
<i>X. rosariensis</i>			
Extracto metanólico total	100	20,61 \pm 0,76 ^a	71,86
Extracto hexanoico	100	57,97 \pm 1,93 ^a	20,85
Extracto diclorometano	100	43,39 \pm 1,77 ^a	40,75
Extracto metanólico parcial	100	38,01 \pm 3,14 ^a	48,11
<i>X. proxima</i>			
Extracto metanólico total	100	-6,52 \pm 4,11 ^a	108,90
Extracto hexanoico	100	72,96 \pm 7,11	---
Extracto diclorometano	100	72,12 \pm 4,02	---
Extracto metanólico parcial	100	71,08 \pm 7,27	2,95

Los valores son el promedio de \pm D.E. de cinco experimentos, con significancia de $p < 0,05$

Actividad antiinflamatoria utilizando el modelo Polimorfo Nuclear Neutrófilo. Ensayos de Citotoxicidad. Se usó el método de exclusión del colorante azul de tripan, utilizando el porcentaje del número de muerte de PMN. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de muerte celular y analizados mediante el test de

ANOVA, obteniéndose citotoxicidad representada por menos del 30%, en el extracto metanólico total (EMT) a concentración de 50 y 100 μ g/ml.

Determinación de la liberación de MPO. Inicialmente los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) fueron aislados de voluntarios sanos usando gelatina al 3% y

Ficoll-Hypaque (Johansson, 2002). El efecto inhibitorio fue evidenciado por la disminución de la liberación de la MPO, en presencia de un inductor de la exocitosis (formil metionil leucil fenil alanina, fMLP).

Determinación de la inhibición de elastasa (EHN). Los PMN fueron inducidos a exocitosis utilizando (fMLP); la elastasa liberada fue expuesta a las diferentes concentraciones de los extractos de *X. rosariensis* y seguidamente determinada su actividad por disminución de la cantidad de cromóforo producido por el sustrato succinil-l-alanil-l alanil-l-vanil-p-nitroanilida (SAAVNA) el cual es hidrolizado por la elastasa, liberando p-nitroanilida (pNA), esta fue leída espectrofotométricamente a 405 nm (Johansson et al., 2002).

Análisis Estadístico. Todos los datos fueron evaluados para normalidad y homogeneidad de varianza empleando el test de Kolmogorov-Smirnof y el test de Barlett, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Siete ensayos de cada extracto fueron analizados. Los datos son presentados como la media \pm error estándar. Las diferencias entre las diferentes concentraciones de los extractos analizados fueron evaluadas mediante el test de ANOVA. Para todos los análisis el criterio de significancia fue establecido a $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores correspondientes a la administración de los extractos de *X. rosariensis* y *X. proxima* en el modelo del edema plantar se muestran en la tabla 1. Los extractos de *X. rosariensis* presentaron la mayor respuesta con el extracto metanólico total (EMT) y un 71.86% de inhibición. Los extractos parciales presentaron una respuesta inhibitoria que se incrementó con la polaridad (EH 20.85%, ED 40.75% y EMP 48.11%). En cuanto a *X. proxima* esta presentó un comportamiento

que se concentró únicamente en el extracto total, ya que los parciales tuvieron una inhibición inferior al 3%. La toxicidad de los EMT y EH, ED y EMP para el modelo PMN, se presentó a la máxima concentración (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) con porcentajes de muerte inferior al 30%. La liberación de MPO a las concentraciones de los extractos evaluados es mostrada en la figura 1, encontrándose diferencias estadísticas significativas para EH, ED y EMT a las concentraciones de 5, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ y a concentraciones de 1, 5, 10 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ para EMP. Los porcentajes de inhibición de elastasa a las concentraciones evaluadas presentaron diferencias estadística significativas a concentraciones de 1, 5, 10, y 25 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos metanólico total, hexanólico y metanólico parcial, y de 5, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto en diclorometano (figura 2), indicando que el extracto metanólico total y los parciales de hexano diclorometano, y metanólico de *X. rosariensis* presentan actividad antiinflamatoria.

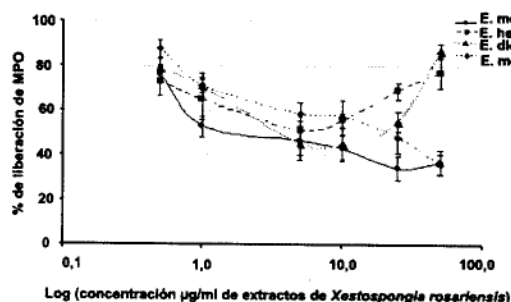


Figura 1. Porcentaje de liberación de la enzima MPO de los PMN en presencia de los extractos de *Xestospongia rosariensis*

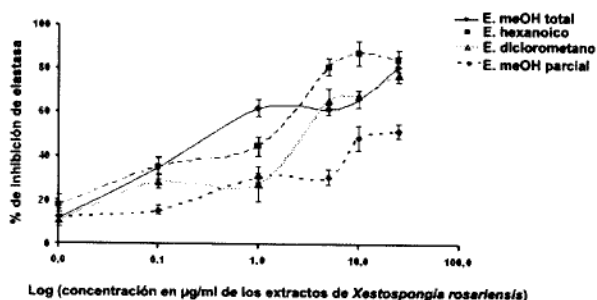


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa en presencia de los extractos de *Xestospongia rosariensis*

Los extractos de las esponjas marinas evaluadas inhibieron el edema plantar inducido por carragenina, a las dosis de estudio; la actividad de los extractos parciales de *X. rosariensis* correlacionaron con la polaridad. La mayor actividad de los extractos totales para ambas especies, indica un posible sinergismo entre sus diferentes constituyentes.

Teniendo en cuenta que también hubo inhibición de la exocitosis, se podría concluir que los extractos de esta esponja marina podrían actuar inhibiendo la desgranulación de los PMN; las concentraciones inhibitorias fueron muy inferiores (10, 25 y 50 µg/ml) a la referenciadas en la literatura para casos similares (Johansson et al., 2001). Estas sustancias podrían ser inhibidores de la formación de especies oxidantes, ya que al bloquear la liberación de MPO inhiben de manera indirecta la formación de estos productos.

REFERENCIAS

- Doná M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. 2003. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation associated angiogenesis and pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology*, 170:4336-4341.
- Dugald TS, Francis YL, William RF. 1994. Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen. Pharmac.*, 25:1285-1296.
- Espada M, Avendaño C. 2001. Inhibidores enzimáticos farmacodinámicos. Pp. 285-287. En: *Introducción a la Química Farmacéutica*. Mc Graw Hill. Interamericana de España. Madrid, España.
- García L, Pereira N, Flores R. 1998. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 17:190-197.
- Johansson S, Goransson U, Luijendijk T, Barklund A, Claeson P, Bohlin L. 2002. Neutrophil multitarget función bioassay to detect antiinflammatory natural products. *Journal of Natural Products*, 65:35-41.
- Kang K, Bae J, Kim M W, Dae-Heui L, Cho U, Myung L, Mu-Sang L, Nam S, Kuettner K, Schuwart DE. 2000. Molecular characteristics of the inhibition of human neutrophils elastase by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Korean Journal Pharmacology*, 32:425-431.
- Los extractos parciales en diclorometano y hexano presentaron porcentajes de inhibición de la enzima elastasa con valores superiores al 80%, de lo que se deriva que algunos de los compuestos presentes en estos extractos prometen ser activos en procesos inflamatorios que se caracterizan por altas concentraciones de esta enzima como sucede en el caso del enfisema pulmonar y fibrosis quística entre otras (Shapiro, 2002). Al respecto son considerados promisorios los extractos con inhibición superior al 80% (Johansson et al., 2002).

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS por el apoyo financiero, al Dr. Sven Zea de INVEMAR por la recolección e identificación de las esponjas marinas y al Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena por su cooperación.

- Kernan M, Faulkner D, Parkanyi L, Clardy J, Carvalho M, Jacobs R. 1989. Lufarielollide, a novel anti-inflammatory terpene from the sponge *Lufarriella* sp. *Experientia*, 45:388-390.
- Rees D, Brain J, Wohl ME, Humes J, Mumford R. 1997. Inhibition of neutrophil elastase in CF sputum by L-658,758. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, 283:1201-1206.
- Shapiro SD. 2002. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochemical Society Transaction*, 30:98-102.
- Srinivasan K, Muruganandan S, Lal J, Chandra S, Tandan SK, Ravi V. 2001. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *Journal Ethnopharmacology*, 78:151-157.
- Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. 1981. Antiinflammatory testing methods: Comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacodynamics*, 4:565-575.
- Wolfe M, Lichtenstein DR, Singh G. 1999. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New Eng. J. Med.*, 340:1888-1899.
- Zhang W, Xue S, Zhao O, Zhang X, Li J, Jin M, Yu X, Yuan Q. 2003. Biopotentials of marine sponge from China oceans: past and future. *Biomolecular Engineering*, 20: 413-419.