

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

DEPARTAMENTO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
TRABAJO DE DIPLOMA

**Título: Estudios para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de
compuestos bioactivos obtenidos a partir de las hojas de la planta
Agave brittoniana Trel.**

Autora: Arlena Vázquez Martín

Tutores: Dr. C. José Orestes Guerra de León

MSc. Yisel González Madariaga

Lic. Raúl Tomás Pareja Rodríguez

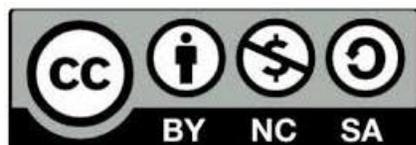
Asesor: Dr. C. Juan Alberto Castillo Garit

**Santa Clara
2018**

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

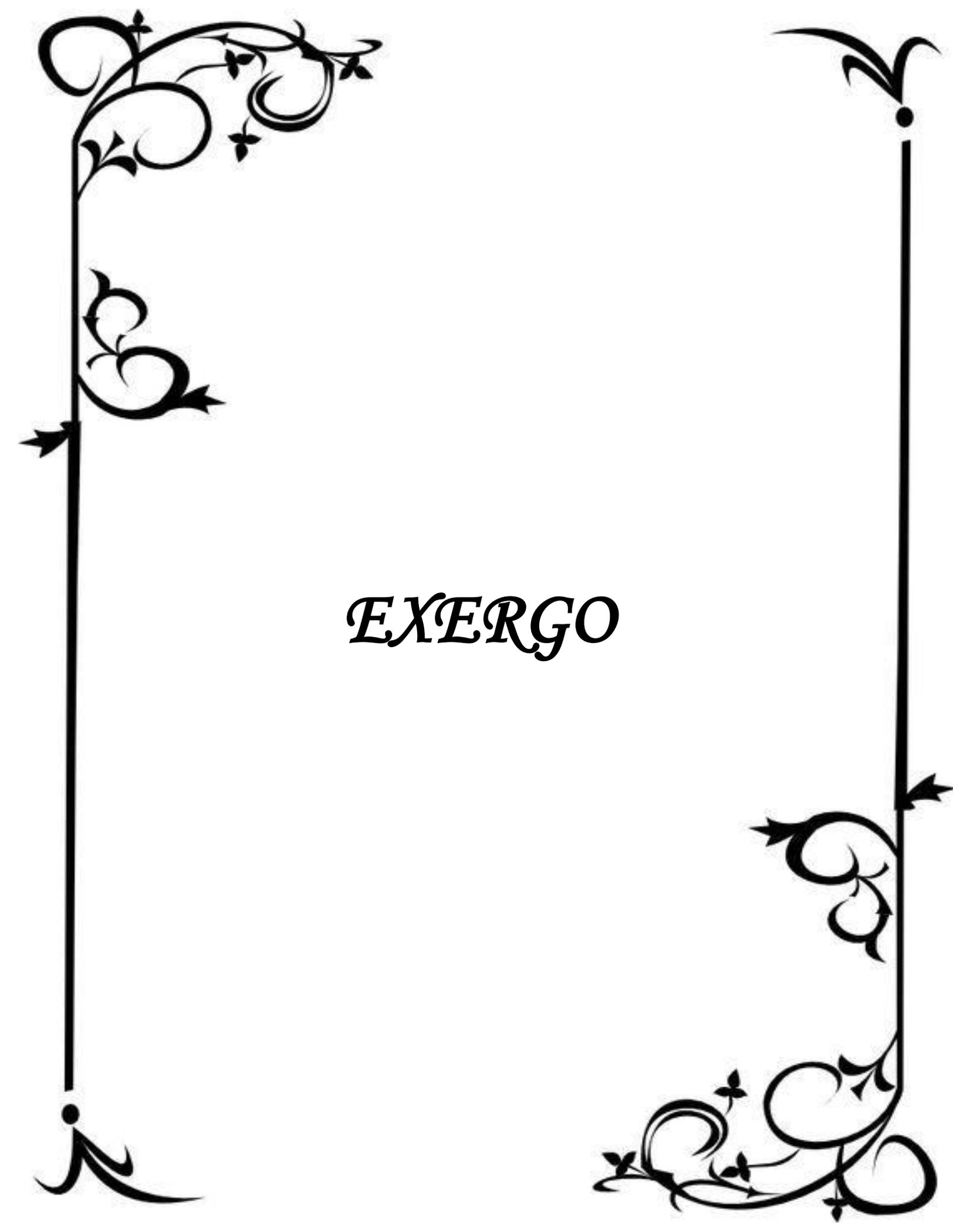
Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central
“Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa
Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



EXERGO

Exergo

*“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino
volverte un hombre de valor”*

Albert Einsten



DEDICATORIA

Dedicatoria

A mis padres y a mi hermana

A decorative border in black ink, featuring intricate floral and scrollwork patterns. The border is composed of two vertical lines, one on the left and one on the right, connected by ornate flourishes at the top and bottom corners. The top-left corner has a large, swirling floral motif. The bottom-left corner has a smaller, simpler flourish. The top-right corner has a large, swirling floral motif. The bottom-right corner has a smaller, simpler flourish. The central text is positioned between the two vertical lines.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A mis padres Miriela y Hermes, por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional. Por guiarme en cada paso que doy y ser mi mayor fuente de inspiración.

A mi hermana Arleydi, por estar siempre a mi lado apoyándome y dándome ánimos. Por todo su cariño y tolerancia.

A mis abuelos Eneida, Eloy, Coral y Omar por quererme mucho y apoyarme durante toda mi vida.

A toda mi familia en general por estar pendiente de mí durante todo este tiempo y brindarme su ayuda cuando más lo necesitaba.

A mis tutores José Orestes, Yisel, Juan Alberto y Raúl por todo lo que aprendí y por la paciencia y el tiempo que dedicaron a mi trabajo.

A Carlos por quererme y comprenderme durante estos últimos meses.

A mi profesor y amigo Pedro por todos sus consejos.

A mi amiga y compañera de laboratorio Dayana por estar a mi lado en todos los imprevistos y por su paciencia.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación profesional y por sus orientaciones en el camino de la ciencia. En especial a Juan Ribalta, Surey, Yennier, Nenena, Neibis, Maira, Lisbet, Oscar y Nani.

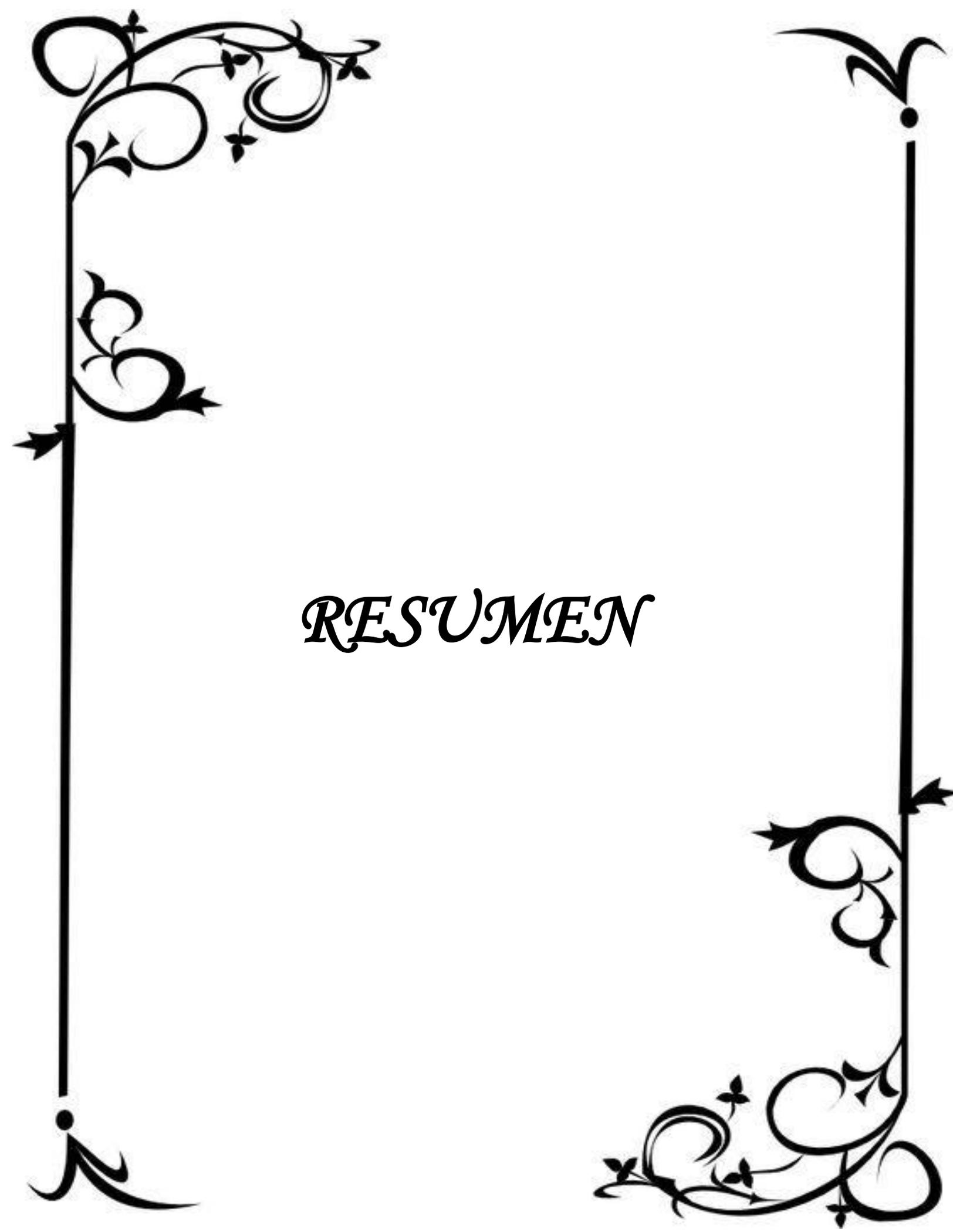
A Pedro Quero por brindarme su ayuda para poder terminar el trabajo.

A todos mis compañeros de aula por compartir estos cinco años de carrera y de estudio constante.

A los técnicos de laboratorio Aracelys, Francisco y Sonia por toda su ayuda.

Y a todos los que no mencioné pero que de una forma u otra estuvieron pendientes de mi trabajo.

¡A TODOS MUCHAS GRACIAS!



RESUMEN

RESUMEN

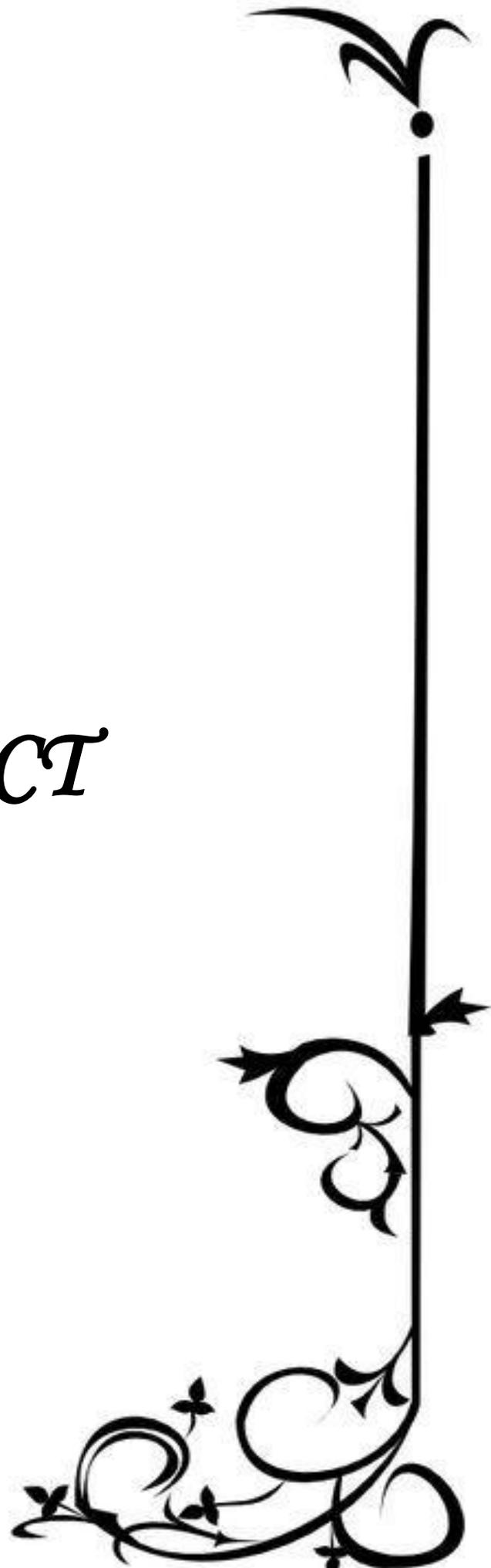
Los metabolitos secundarios mayoritarios del *Agave brittoniana* Trel. son las saponinas y sapogeninas esteroidales. Si bien el crudo de saponinas ha mostrado actividad antiinflamatoria en modelos experimentales crónicos, no se conoce de ningún estudio referente a las sapogeninas o su mecanismo de acción frente a blancos terapéuticos. Para comprobar el efecto antiinflamatorio de las sapogeninas esteroidales se realizaron estudios *in silico* e *in vivo*. Se desarrolló un modelo QSAR para predecir la inhibición de las sapogeninas frente a la enzima ADAM-17 a través de un cribado virtual. La obtención de las sapogeninas se realizó combinando la hidrólisis ácida y la cromatografía de columna sílica-gel fase normal. La actividad antiinflamatoria *in vivo* fue evaluada empleando modelo crónico de granuloma inducido por pellet de algodón empleando cinco grupos experimentales. El modelo QSAR mostró buena capacidad predictiva ($Q_{ext}= 52.22\%$) y predijo de manera eficaz el potencial de inhibición en todas las sapogeninas frente al ADAM-17 siendo la yucagenina, la clorogenina y la rockogenina las de mejores resultados. Se logró de forma efectiva el fraccionamiento del crudo de sapogeninas, la fracción rica en yucagenina con mayor grado de pureza se empleó en estudio experimental. El estudio *in vivo* corroboró que las fracciones de sapogeninas evaluadas mostraron buenas propiedades antiinflamatorias, aunque menores que la indometacina. El crudo de sapogeninas mostró el mejor resultado, conociendo que la yucagenina es la sapogenina mayoritaria podemos concluir que esta molécula presenta la mayor contribución al efecto antiinflamatorio.

Palabras claves:

Agave brittoniana Trel., sapogeninas esteroidales, antiinflamatorio, QSAR, ADAM-17, cromatografía, granuloma



ABSTRACT

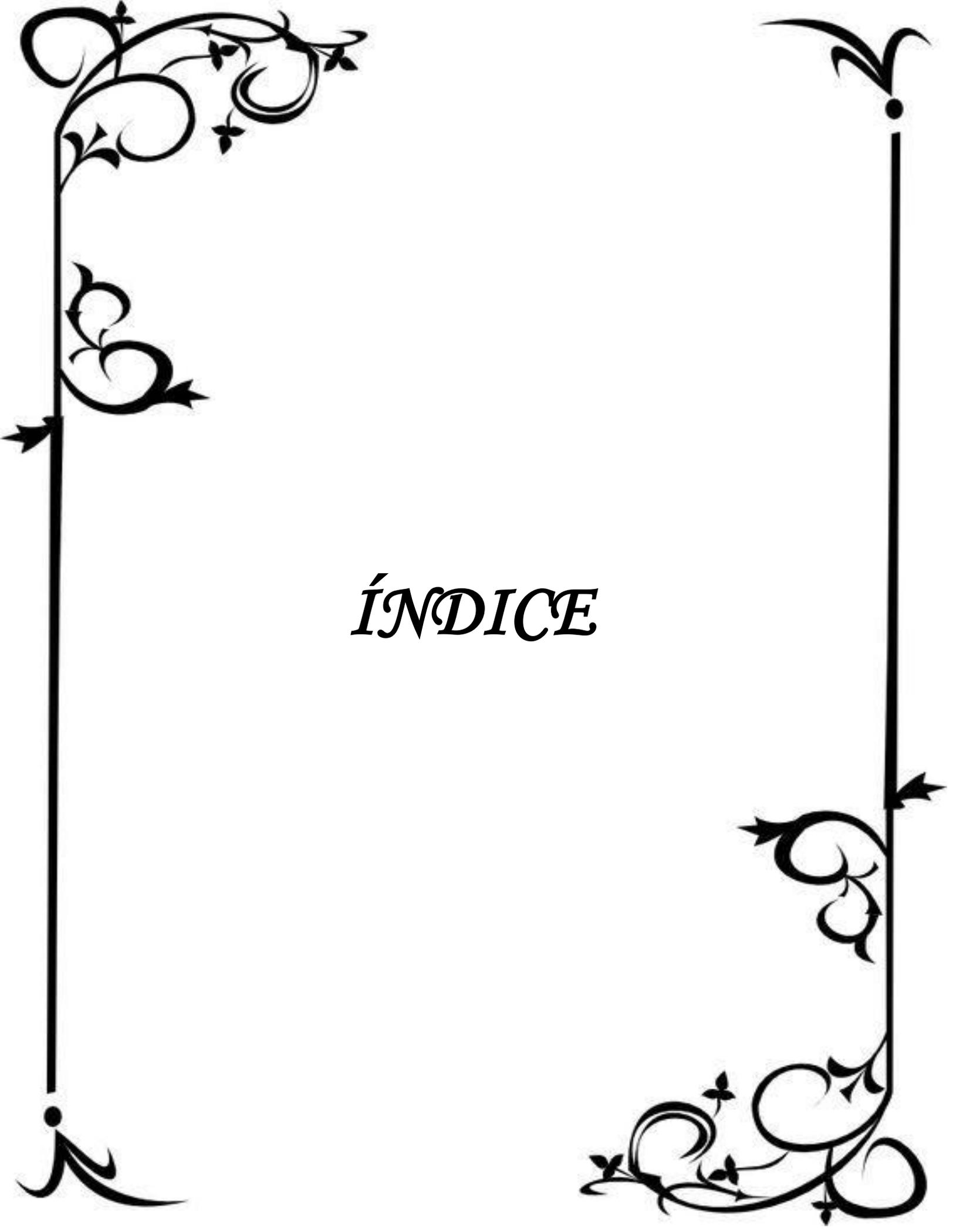


ABSTRACT

The major secondary metabolites of *Agave brittonian* Trel. are steroidal saponins and sapogenins. Although saponin crude oil has shown anti-inflammatory activity in chronic experimental models, there is no known study of sapogenins or their mechanism of action against therapeutic targets. To check the anti-inflammatory effect of the steroidal sapogenins, *in silico* and *in vivo* studies were carried out. A QSAR model was developed to predict the inhibition of sapogenins against the ADAM-17 enzyme through a virtual screening. The sapogenins were obtained by combining the acid hydrolysis and the silica-gel normal phase column chromatography. Anti-inflammatory activity *in vivo* was evaluated by using a chronic model of granuloma induced by cotton pellets using five experimental groups. The QSAR model showed good predictive capacity ($Q_{ext} = 52.22\%$) and effectively predicted the potential for inhibition in all sapogenins against ADAM-17, with yucagenin, chlorogenin and rockogenin providing the best results. The fractionation of sapogenin crude was effectively achieved, the fraction rich in yucagenin with a higher degree of purity was used in an experimental study. The *in vivo* study corroborated that the sapogenin fractions evaluated showed good anti-inflammatory properties, although less than indomethacin. Sapogenin crude showed the best result, knowing that yucagenin is the major sapogenin we can conclude that this molecule has the greatest contribution to the anti-inflammatory effect.

Key words:

Agave brittonian Trel, steroidal sapogenins, anti-inflammatory, QSAR, ADAM-17, chromatography, granuloma



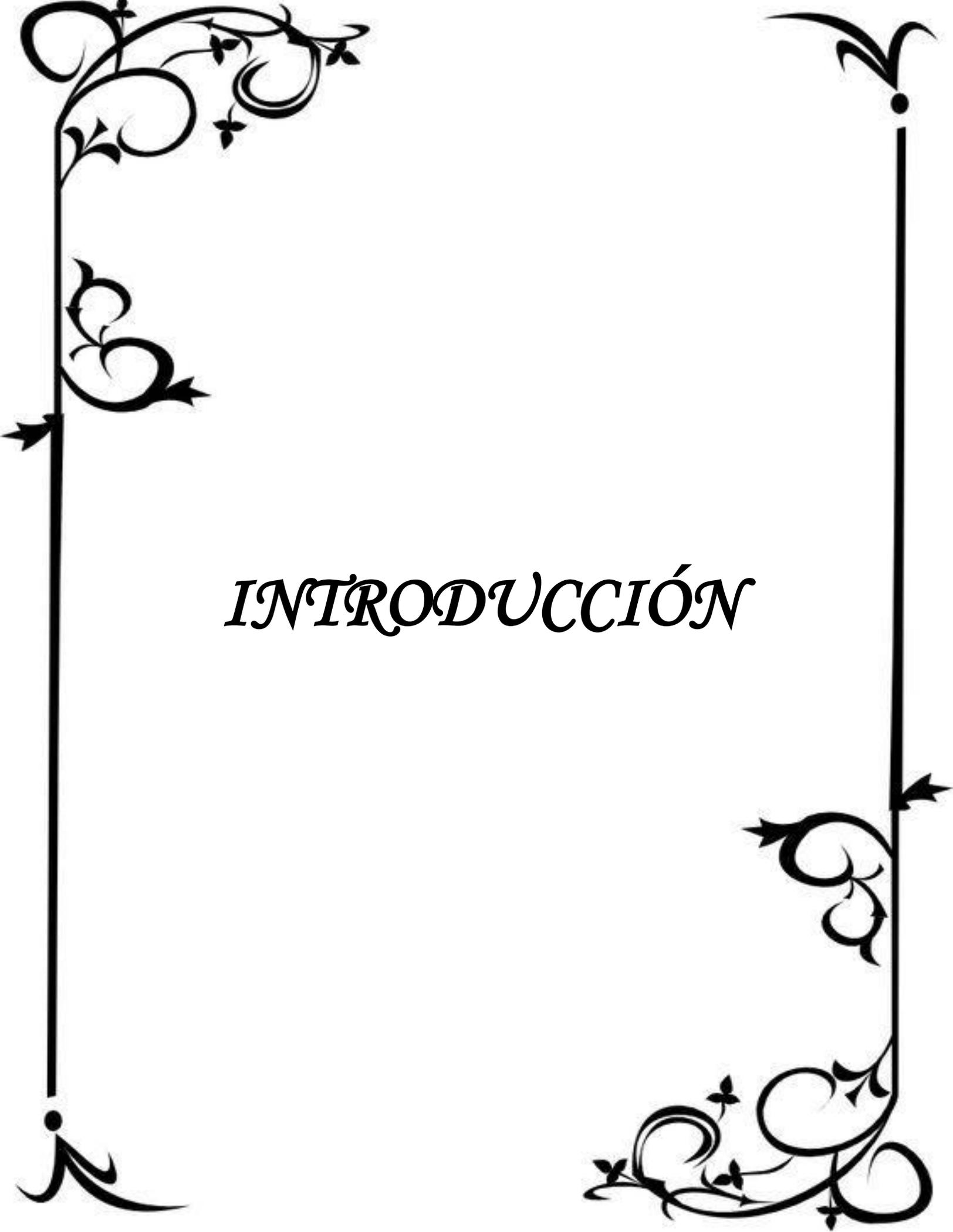
ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	18
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	24
1.1. Inflamación	24
1.1.1. Inflamación crónica	25
1.1.2. Modelos experimentales de inflamación	26
1.1.3. Actividad antiinflamatoria de compuestos de origen natural.	26
1.1.4. Factor de Necrosis Tumoral (FNT- α) y su relación con el ADAM-17.	27
1.2. Saponinas y sapogeninas esteroidales.	28
1.2.1. Saponinas esteroidales.	28
1.2.2. Sapogeninas Esteroidales	28
1.2.3. Actividad antiinflamatoria de saponinas y sapogeninas esteroidales.	30
1.3 . <i>Agave brittoniana</i> Trel	31
1.3.1. Generalidades	31
1.3.2. Sapogeninas esteroidales presentes en el <i>Agave brittoniana</i> Trel	31
1.4. Estudios QSAR	33
1.4.1. Descriptores Moleculares.	33
1.4.2. Métodos Estadísticos.	34
1.4.3. Estudios Computacionales con saponinas esteroidales derivadas de la planta <i>Agave brittoniana</i> Trel	38
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. Modelación QSAR	41
2.1.1. Conformación de la base de datos	41
2.1.2. Parametrización cuantitativa de la estructura molecular	42
2.1.3. Generación de modelos	42

2.2. Obtención de extractos y fracciones derivados de hojas de <i>Agave brittoniana</i>	
Trel.....	43
2.2.1. Equipos principales	43
2.2.2. Reactivos empleados	43
2.2.3. Técnicas cromatográficas.	43
2.2.4. Recolección, identificación y selección del material vegetal	44
2.2.5. Preparación del material vegetal	44
2.2.6. Obtención del extracto hidroalcohólico.....	44
2.2.7. Obtención del extracto n-butanólico	45
2.2.8. Obtención de sapogeninas esteroidales	45
2.2.9. Fraccionamiento del crudo de sapogeninas	46
2.3. Evaluación farmacológica de la actividad antiinflamatoria	47
2.3.1. Análisis estadístico	49
2.3.2. Aspectos éticos y de bioseguridad.....	49
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. Modelación QSAR	51
3.1.1. Parametrización cuantitativa de la estructura molecular	51
3.1.2. Generación de modelos QSAR.....	51
3.1.3. Cribado virtual de las sapogeninas esteroidales	56
3.2. Obtención de los extractos	57
3.2.1. Preparación del material vegetal	58
3.2.2. Obtención del extracto hidroalcohólico.....	58
3.2.3. Obtención del extracto n-butanólico	58
3.2.4. Obtención del crudo de sapogeninas esteroidales	59
3.2.5. Fraccionamiento del crudo de sapogeninas esteroidales	61

3.3. Evaluación farmacológica de las fracciones del crudo de sapogeninas	63
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	78



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta defensiva del organismo frente a factores endógenos (necrosis tisular) o factores exógenos (lesiones causadas por agentes mecánicos, físicos, químicos, biológicos e inmunológicos). Esta respuesta protectora tiene como fin aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente preparar al tejido dañado para su reparación; es un proceso que consta de cambios vasculares y celulares mediados por diversos factores químicos que se manifiestan clínicamente. En la actualidad existen muchos medicamentos destinados al tratamiento de la inflamación entre los cuales podemos mencionar el ibuprofeno, paracetamol y el diclofenaco. Gran parte de estos medicamentos son obtenidos mediante procesos de síntesis en un laboratorio químico. Hace algunas décadas se ha retomado la alternativa de obtención de nuevos fármacos con fines antiinflamatorios a partir de los productos naturales. Existe un grupo de plantas pertenecientes al género *Agave* que son objeto de investigación con el fin de identificar posibles actividades biológicas y entre ellas la antiinflamatoria. Los componentes más estudiados, desde el punto de vista fitoquímico, son las saponinas y sapogeninas esteroidales con probadas actividades larvicidas, antimicóticas, molusquicidas, antivirales, anticancerígenas e hipercolesterolémicas; además de ser precursores sintéticos para la producción de hormonas. Estas plantas están ampliamente distribuidas en el continente Americano y son conocidas en muchas partes con el nombre de “Magueyes”; fueron veneradas por varios grupos de aborígenes y han sido fuente de fibras, alimentos, medicinas, bebidas alcohólicas, combustibles y materiales de construcción, usos que han llegado hasta nuestra época (Zayas, 1996).

El *Agave brittoniana* Trel. es un ejemplo de planta rica en saponinas y sapogeninas esteroidales que desde tiempos muy antiguos ha sido considerada como una planta con propiedades medicinales, sobre todo dentro de la medicina indígena. En el estudio de la posible actividad antiinflamatoria del extracto de esta planta se han llevado a cabo experimentos a nivel de laboratorio para comprobar su eficacia en colitis ulcerativa o ulcerosa (CU), enfermedad inflamatoria intestinal (Triana, 2014). Los resultados obtenidos en estos estudios han sido alentadores. Teniendo en cuenta la composición fitoquímica de las hojas de esta planta se piensa que los responsables de la actividad

antiinflamatoria son las saponinas esteroidales, aunque esta hipótesis no ha sido aún probada y no se conoce cuál o cuáles de estas son las que la poseen o si las sapogeninas pudieran ser más activas que sus respectivas saponinas.

Una vía para encontrar respuesta de forma teórica a esta interrogante es el empleo de las herramientas derivadas de la *química-matemática*, rama de la química dedicada a aplicar relaciones matemáticas en la caracterización de fenómenos químicos. Una de las finalidades de esta ciencia está centrada en encontrar relaciones cuantitativas entre la estructura molecular y las propiedades (químicas, químico-físicas y biológicas) de las sustancias (Kier and Hall, 1999). Es bien conocido que las propiedades químicas, químico-físicas y biológicas de las sustancias están en estrecha relación con su estructura molecular, pudiendo describirse usando diversos métodos y estrategias matemáticas (Kier and Hall, 1999). El resultado final de estos procedimientos matemáticos que transforman la información estructural (codificada en una representación simbólica de la molécula) en un número (o conjunto de números) de utilidad, se les conoce como descriptores moleculares (DMs). Los resultados numéricos por ellos expresados pueden ser relacionados estadísticamente con determinadas propiedades (o actividades) moleculares, por ello se convierten en una poderosa vía para estudiar la relación entre la estructura molecular y las propiedades químico-físicas y biológicas de las sustancias (Todeschini and Consonni, 2009).

Muchos de los modelos obtenidos en estos estudios se relacionan directamente con el coeficiente de partición 1-octanol/agua ($\log P$) el cual es un parámetro fisicoquímico que permite determinar de modo cuantitativo, el grado de lipofilia (también denominada hidrofobicidad) de una molécula, permitiendo inferir cómo se comportará en el entorno de los fluidos biológicos del organismo y cómo será su paso mediante difusión pasiva a través de membranas biológicas (Wasik SP, 1981). Resultados teóricos realizados por el grupo de investigación de Productos Naturales de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas han demostrado que la liposolubilidad de las saponinas esteroidales va aumentando a medida que el número de grupos azúcares es menor en la estructura molecular siendo en este caso las sapogeninas esteroidales las de mayor liposolubilidad.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mediadores de la inflamación son las citoquinas o citocinas que son proteínas producidas por numerosos tipos de células (linfocitos, macrófagos y células de los tejidos epitelial, endotelial y conjuntivo) que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias (Robbins et al., 2015). El Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α) es una citoquina pro-inflamatoria y de defensa del huésped, cuya producción elevada lleva a enfermedades inflamatorias crónicas. Estudios *in vivo* han demostrado que esta citoquina es activada por la desintegrina y metaloproteínasa 17 conocida como ADAM-17 (Jarry, 2006) (Brennan et al., 2008). Las sapogeninas esteroidales, atendiendo a sus propiedades lipofílicas, pueden atravesar las membranas biológicas, llegar a los enterocitos, alcanzar la circulación sanguínea y llegar a las células dianas para inhibir el ADAM17 evitando la producción del FNT- α . Con el fin de conocer si las sapogeninas esteroidales son capaces de actuar sobre esta enzima se emplea la modelación computacional basada en enfoques cuantitativos orientados a encontrar relaciones entre la estructura molecular y las actividades moleculares medidas o calculadas, conocidas como Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR por sus siglas en inglés) (Todeschini and Consonni, 2009). En la actualidad los métodos QSAR constituyen uno de los enfoques más utilizados en el diseño de fármacos.

Lo planteado anteriormente propició que se realizara la siguiente investigación tomando como **Problema científico** lo siguiente:

¿Es posible comprobar el efecto antiinflamatorio de las sapogeninas esteroidales aisladas de las hojas de la planta *Agave brittoniana* Trel?

Para dar solución a esta interrogante se formuló la correspondiente **Hipótesis**:

Combinando herramientas de la química computacional y teórica con estudios en modelos *in vivo* de inflamación es posible comprobar el efecto antiinflamatorio de las sapogeninas esteroidales aisladas de las hojas de la planta *Agave brittoniana* Trel.

Para fundamentar la dicha hipótesis, se trazaron los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar la actividad antiinflamatoria de las sapogeninas esteroidales aisladas de hojas de la planta *Agave brittoniana* Trel.

Objetivos específicos:

1. Predecir la capacidad de inhibición de las sapogeninas esteroidales frente a la enzima ADAM-17 empleando la modelación QSAR.
2. Obtener las sapogeninas esteroidales mayoritarias de la especie *Agave brittoniana* Trel. a partir del extracto de saponinas esteroidales.
3. Evaluar en modelo crónico de granuloma inducido por pellet de algodón la actividad antiinflamatoria de las sapogeninas esteroidales mayoritarias aisladas de la especie *Agave brittoniana* Trel.



MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Inflamación

Etimológicamente, inflamación significa flama (del griego phlox), de donde proviene el término flogístico, denotación antigua de la inflamación. Es una respuesta de los tejidos vascularizados a las infecciones y al daño tisular, que hace que las células y moléculas encargadas de la defensa del anfitrión pasen de la circulación a localizaciones en las que son necesarias, a fin de eliminar los agentes causantes de la agresión (Robbins et al., 2015).

Entre los mediadores de la defensa que se desencadenan durante la inflamación se encuentran los leucocitos fagocíticos, anticuerpos y proteínas del complemento. La mayoría de ellos circula en la sangre, pero el proceso inflamatorio hace que estas células y proteínas lleguen a los tejidos dañados o necróticos y a los organismos invasores.

La inflamación se puede clasificar tomando en cuenta el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización. Por la duración pueden ser:

a. Agudas: Este tipo de inflamación es una respuesta inmediata al agente agresor cuya finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta.

b. Crónicas: Es un proceso prolongado, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación.

-Granulomatosa: Una forma específica de inflamación crónica, la cual consiste en la presencia de granulomas.

El tratamiento de la inflamación se enfrenta generalmente con dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios. Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides y los AINEs (analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos).

Los esteroideos son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos mecanismos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citoquina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. También reducen la proliferación de linfocitos T. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, y mometasona (Gómez Estrada, 2011).

Los AINEs son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio (Gómez Estrada, 2011).

1.1.1. Inflamación crónica

A diferencia de la inflamación aguda, manifestada a través de cambios vasculares, edema e infiltración predominante de neutrófilo, la inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de células mononucleares como: macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. También por la destrucción de tejidos inducida por el agente causal persistente o por células inflamatorias e intentos de curación mediante reposición del tejido conjuntivo dañado, desarrollada mediante angiogenia (proliferación de pequeños vasos sanguíneos) y, en particular, fibrosis (Robbins et al., 2015).

Los macrófagos son las células predominantes en la mayoría de las reacciones inflamatorias crónicas. Estas células contribuyen a la reacción secretando citoquinas y factores de crecimiento, que actúan sobre diversas células, destruyendo los agentes invasores y tejidos extraños, y activando a otras células, en especial a los linfocitos T. Existen dos vías de activación de los macrófagos, llamadas vía clásica y alternativa. Los macrófagos activados por vía clásica, aumentan las enzimas lisosómicas, todas las cuales mejoran su capacidad para inducir la muerte de los organismos ingeridos, a la vez que secretan citoquinas estimuladoras de la inflamación. La activación de macrófagos por vía alternativa repara los tejidos. Los linfocitos T y B amplifican y propagan la inflamación

crónica, aunque la función más destacada de estos linfocitos es la de actuar como mediadores de la actividad adaptativa, que aporta defensa contra patógenos. Las células plasmáticas producen anticuerpos dirigidos contra antígenos en el sitio inflamatorio o contra componentes tisulares alterados (Robbins et al., 2015).

1.1.2. Modelos experimentales de inflamación

Existen protocolos establecidos para el uso de modelos experimentales de inflamación. Estos se clasifican tanto agudos como crónicos. Dentro de los agudos se encuentra la inducción de edema plantar por carragenina, modelos pleurales, modelo de inflamación aguda en la oreja y migración de leucocitos específicos. Dentro de los crónicos se encuentra evaluación de la inflamación, la matriz del cartílago, y la pérdida del hueso en experimentos de artritis monoarticular, inducción de artritis por colágeno, modelo de inflamación del ponche de la oreja y el modelo de granuloma inducido por pellet o disco de algodón (Winyard, 2003).

1.1.2.1. Granulomas inducidos por discos de algodón

Descrito por Meier en 1950 y posteriormente modificado por Sheth en 1972. En este biomodelo se forman granulomas inducidos por la implantación de discos de algodón en la región interescapular del animal.

1.1.3. Actividad antiinflamatoria de compuestos de origen natural.

En los últimos años, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural, empleando extractos de diferentes plantas en modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Olajide et al., 2003, donde los autores evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto en agua de la corteza del tallo de la planta *Bridelia ferruginea* Benth, empleando el modelo del edema plantar inducido por carragenina, y el granuloma inducido por discos de algodón, utilizando como fármaco de referencia la indometacina (Olajide et al., 2003). En el trabajo de Gautam et al., 2011, evaluaron los efectos antiinflamatorios del extracto etanólico de *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth. (Gautam R, 2011). Akdemir y colaboradores et al., 2010, realizaron el estudio fitoquímico de la especie *Verbascum macrocarpum* Boiss, las partes aéreas de la especie se han utilizado para tratar problemas respiratorios,

hemorroides y otros tipos de enfermedades inflamatorias en la medicina tradicional turca (Akdemir et al., 2010). La mezcla de saponinas triterpénicas derivada de *Aesculus hippocastanum* (Bhattaram et al., 2002); el extracto etanólico de las hojas, extracto fenólico y los aceites esenciales (cineol o eucaliptol) del *Eucalyptus globulus* Labill (Gómez et al., 2005) (Vazquez G, 2008) también han sido estudiadas como posibles antiinflamatorios.

1.1.4. Factor de Necrosis Tumoral (FNT- α) y su relación con el ADAM-17.

El FNT- α es un mediador de la inflamación, producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección. Fue nombrado así por su habilidad para destruir células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores en ratones. Pertenece a una familia de ligandos que activan a una familia correspondiente de receptores que inician señales para la proliferación celular y apoptosis, y que están en casi todas las células (Robbins et al., 2015). El señalamiento intracelular mediado por FNT- α se da a través de interacciones con dos de sus receptores ligados a células: el p55 y el p75. Estos forman dímeros en la superficie celular donde se unen a una molécula de FNT- α trimérica y así inician la transducción de señales (Jarry, 2006).

La enzima convertidora del FNT- α conocida como ADAM-17, es una endopeptidasa con membrana de zinc (Zn) miembro de ADAM (una enzima que contiene desintegrina y metaloproteasa) (Singh Bahia and Silakari, 2009). Esta enzima es principalmente responsable de la liberación de FNT- α soluble. De hecho, la proteólisis del enlace peptídico Ala76-Val77 del FNT- α de 26 kDa unida a la membrana está causada por el ADAM-17, anclada a membrana de 85 kDa (Singh Bahia and Silakari, 2009) y esta catálisis conduce a la eliminación de la forma soluble y activa de citoquina (s FNT- α) de la célula como homotrímero de fragmento terminal de 17 kDa que consiste en 157 aminoácidos no glicosilados. Se ha informado que el FNT- α desempeña un papel fundamental en la progresión de la enfermedad de la artritis reumatoide (AR), la psoriasis y la enfermedad de Crohn a través de la mediación de respuestas inmunoinflamatorias de otras citocinas proinflamatorias. Con el éxito comercial de los productos biológicos, como Remicade y Enbrel que reducen el nivel soluble de FNT- α , una búsqueda intensiva de moléculas pequeñas disponibles por vía oral que interrumpen la ruta de señalización del

FNT- α , ha despertado el interés de la comunidad farmacéutica (Singh Bahia and Silakari, 2009). De las muchas estrategias posibles para regular la producción de FNT- α , la inhibición del ADAM-17 ha sido durante mucho tiempo visto como uno de los objetivos más prometedores para moléculas pequeñas.

1.2. Saponinas y sapogeninas esteroideas.

1.2.1. Saponinas esteroideas.

Las **saponinas** (del latín *sapo*, "jabón"), son glicósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas vía parenteral y no así por vía oral. Su toxicidad pudiera estar relacionada con su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea. Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, como por ejemplo la yuca, el ginseng, la quinua o el quillay, entre otros (Armas, 2011).

1.2.2. Sapogeninas Esteroidales

Las sapogeninas esteroideas, también conocidas como el aglicón derivado de las saponinas esteroideas poseen un esqueleto base tetracíclico característico de los esteroides, con la particularidad de que la cadena lateral que se origina a partir del C-17 puede adoptar varias formas (Agrawal et al., 1985). En la naturaleza se encuentran en pequeñas concentraciones pues generalmente están glicosilados con varias unidades de monosacáridos que se unen mediante enlaces glicosídicos. A diferencia de las saponinas esteroideas que pueden tener la parte esteroidea de forma espitrostánica, furostánica y furoespirostánica; la estructura esteroidea de las sapogeninas esteroideas siempre tiene en la cadena lateral los dos anillos adicionales E y F cerrados.

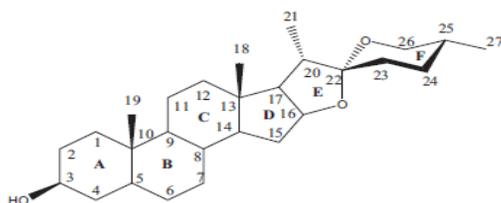


Figura 1. Estructura de una sapogenina esteroidal

1.2.2.1. Hidrólisis de las saponinas esteroidales

Para este trabajo se empleó la hidrólisis como el método más conveniente para obtener el crudo de sapogeninas esteroidales. La hidrólisis se realiza en condiciones ácidas, de acuerdo con la literatura, para facilitar el rompimiento del enlace glicosídico donde se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina. El tamaño molecular de las sapogeninas es considerablemente menor en comparación con las saponinas de las que se derivan las cuales se encuentra entre los 600 Da y los 2700 Da (Guerra de León, 2005). Este proceso es de suma importancia para la obtención y purificación de sapogeninas esteroidales.

1.2.2.2. Métodos para verificar grado de hidrólisis

Los métodos para determinar la presencia de saponinas pueden ser empleados para, de una manera indirecta, verificar si la hidrólisis realizada se alcanzó de manera parcial o total. El ensayo de espuma es un ensayo presuntivo de presencia de saponina esteroidal, donde se produce una espuma persistente al ser agitadas sus soluciones acuosas, aunque existe el inconveniente que otros metabolitos también pueden dar positivo a este ensayo. El ensayo de hemólisis, basado en el poder tensoactivo de las saponinas y su capacidad de hemolizar los hematíes, permite no solo la identificación, sino también la cuantificación, sin embargo es conocido la capacidad de algunos tipos de saponinas de ser más hemolíticas que otras. La presencia de azúcares reductores es indicativa de ruptura del enlace glicosídico y de la liberación de las sapogeninas, por lo que otro método puede basarse en la identificación cualitativa de azúcares reductores empleando el reactivo de Fehling.

1.2.3. Actividad antiinflamatoria de saponinas y sapogeninas esteroidales.

Son varios los trabajos dedicados a la descripción de la actividad antiinflamatoria de las saponinas esteroidales. Ejemplo de lo anterior es la saponina furostánica bidesmósica aislada de las hojas del *Agave attenuata* (Da Silva et al., 2002). Se comprueba su actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la permeabilidad capilar. Los resultados se dan en porcentajes, tomando el ensayo en blanco como control y 100%. De esta forma dicha saponina mostró inhibición en un 30%, mientras que la Indometacina (control positivo) inhibió la permeabilidad capilar en un 20%. Adicionalmente se demostró la carencia de actividad hemolítica en este compuesto. También se demostró la actividad antiinflamatoria en el crudo de saponinas de la *Yucca schidigera* Roezl (Cheeke et al., 2006). Saponinas aisladas de especies de plantas han mostrado actividad antiinflamatoria aguda evaluadas en modelo experimental de edema inducido por carragenina, por ejemplo, el estudio realizado por Gepdiremen et al., (2005), donde dos saponinas aisladas a partir de *Hederahelix* y dos de *Hederacolchica*, mostraron actividad antiinflamatoria aguda siendo más efectivas en la segunda fase de la inflamación (de 1 a 4 horas después de la administración oral de 0.02 mg/Kg). Zhang et al., 2008, reportaron la inhibición de varios mediadores de la inflamación (IL-18, IL-1 β y metaloproteinasas 2 y 9) por saponinas aisladas de *Panaxnotoginseng* en el tratamiento de la aterosclerosis, enfermedad cardiovascular que se puede desarrollar por etapas inflamatorias crónicas. En estudios previos realizados por Cho et al., 2001 (Kim et al., 1998), se había reportado que los ginsenósidos (Rb1 and Rb2), obtenidos de las raíces de *Panax ginseng*, suprimieron la producción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) en macrófagos de roedores (RAW264.7) y humanos (U937) estimulados por LPS. El estudio realizado por Martín et al., 2016, al crudo de saponinas del *Agave brittoniana* Trel, presentó actividad antiinflamatoria en modelo de inducción de granuloma por pellet de algodón (Martín, 2016)

1.3 . *Agave brittoniana* Trel

1.3.1. Generalidades

Esta especie pertenece al género *Agave*, el cual está constituida por más de 480 especies, formando parte de los afloramientos más antiguos, que datan aproximadamente de hace 15 millones de años (Eguiarte et al., 2000). Éstas son nativas de América y se distribuyen desde Dakota del Norte (Estados Unidos) pasando a través de los Andes hasta Bolivia y Paraguay, incluyendo Centroamérica y las Antillas, siendo México donde mayor diversificación existe (Mendoza et al., 1995).

Dicha planta es de tipo herbáceo suculenta, sus hojas se encuentran dispuestas en forma de roseta, generalmente con espinas en los márgenes o “dientes” y una espina terminal. Es una planta perenne o monocárpica. Su inflorescencia emerge del centro de la roseta y puede ser en forma de espiga o ramificada, con las flores creciendo en umbelas sobre los pedúnculos laterales. Después de varios años de crecimiento llega a alcanzar una altura que sobrepasa los seis metros, agotando a la planta que poco después muere. Su reproducción puede ser sexual o asexual mediante los vástagos que emergen de rizomas de la planta madre. La clasificación taxonómica de esta planta es: reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Liliopsida* (Monocotiledóneas), subclase *Lilidae*, orden *Liliales* familia *Asparagaceae*, género *Agave*, sección *Rigidae*, especie: *Agave brittoniana* Trel (Armas, 2011).

Al igual que otras plantas del género *Agave*, esta especie se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra vegetal constituida por ceras, polialcoholes y poliazúcares. Como metabolitos secundarios mayoritarios encontramos saponinas esteroidales, que pueden ser transformadas a sapogeninas esteroidales por hidrólisis ácida o enzimática y en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas entre las que se encuentra sus propiedades antiinflamatorias (Armas, 2011).

1.3.2. Sapogeninas esteroidales presentes en el *Agave brittoniana* Trel

A continuación se muestran las sapogeninas del *Agave brittoniana* Trel (Guerra et al., 2008) (Figura 2). Todas se presentan como sólidos blancos amorfos en estado puro y el

núcleo base mayoritario es el correspondiente a la yucagenina (Guerra et al., 2008) (Figura 2a).

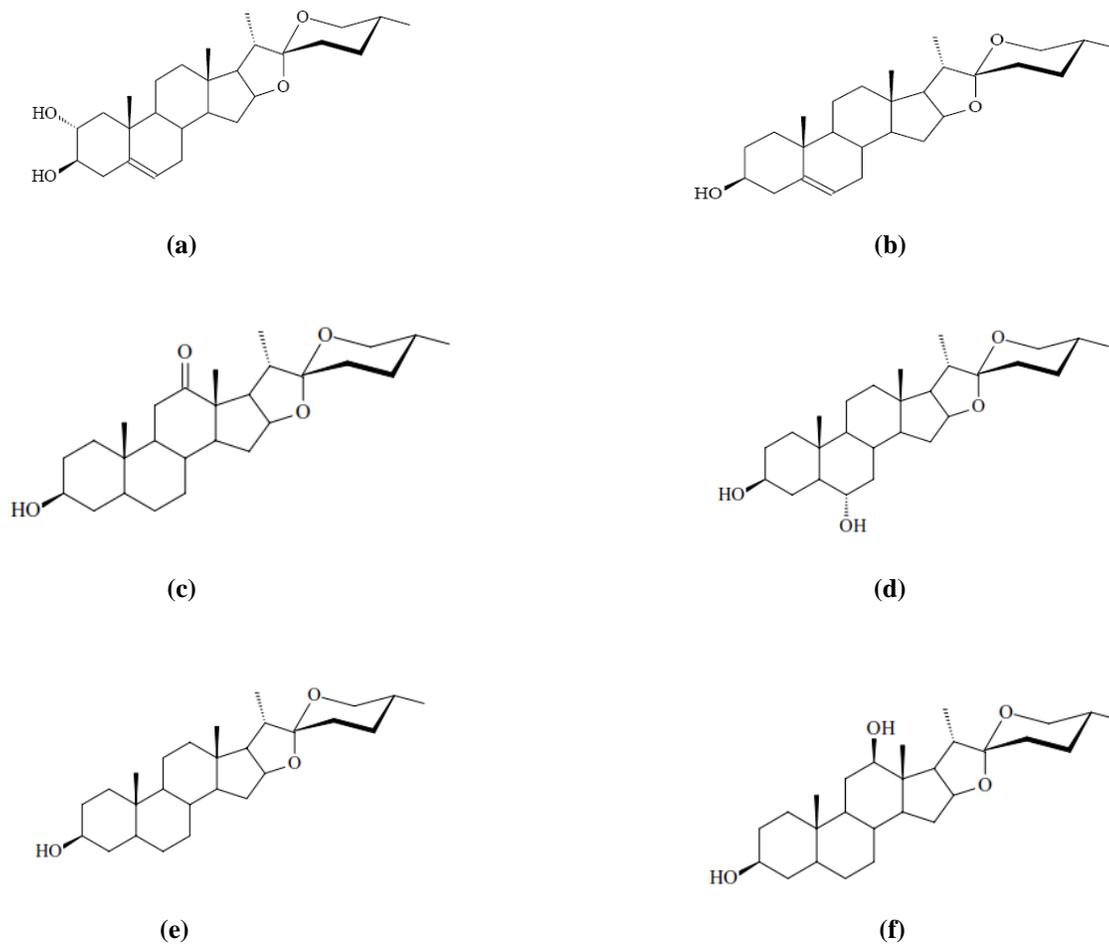


Figura 2. (a) (Yucagenina) 25R-epi-5-en-2 α , 3 β -diol. (Guerra de León, 2005), (b) (Diosgenina) 25R-epi-5-en-3 β -ol (Guerra de León, 2005), (c) (Hecogenina) 3 β -hidroxi-5, 25R-epi-12-ona (Guerra de León, 2005), (d) (Clorogenina) 5 α , 25R-epi-3 β , 6 α -diol (Guerra de León, 2005), (e) (Tiogenina) 5 α , 25R-epi-3 β -ol (Guerra de León, 2005), (f) (Rockogenina) 5 α , 25R-epi-3 β , 12 β -diol (Guerra de León, 2005)

1.3.3. Actividad antiinflamatoria de saponinas presentes en *Agave brittoniana*

Trel

La hecogenina y tiogenina aislada de *A. americana*, presentan actividad antiinflamatoria mayor que el extracto acuoso obtenido de las hojas de la planta y que la droga antiinflamatoria esteroide dexametasona, en el modelo de la carragenina inducida por edema sub-plantar en ratas (Peana et al., 1997). La diosgenina, también presente en *A.*

brittoniana, es una sapogenina que se le ha comprobado su efecto antiinflamatorio en diferentes plantas. En un estudio en roedores desarrollado por Punitha et al., 2013, donde se utilizó el modelo de edema plantar inducido por carragenina, la diosgenina aislada a partir de *Tinospora malabárca* (Lam.) mostró un efecto antiinflamatorio significativo.

1.4. Estudios QSAR

Los estudios de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) constituyen enfoques cuantitativos orientados a encontrar relaciones entre la estructura molecular y las actividades moleculares medidas o calculadas (Todeschini and Consonni, 2008). Los estudios QSAR datan desde el 1868 y desde entonces se han utilizado ampliamente en la modelación de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica (Todeschini and Consonni, 2008). Actualmente, quizás sea el enfoque más utilizado en el diseño de fármacos. En estos métodos se utilizan múltiples descriptores moleculares de la estructura química, combinados con la aplicación de técnicas quimiométricas para derivar modelos. Los estudios QSAR constan de varios pasos comunes (Van de Waterbeemd, 1995a) 1) Formulación del problema; 2) Parametrización cuantitativa de la estructura molecular; 3) Medición de la propiedad de interés (efectos biológicos u otros); 4) Elección del tipo de modelo QSAR 5) Selección de los compuestos (diseño estadístico de las series); 6) Análisis matemático de los datos y validación (interna y externa) de los modelos obtenidos; 7) Interpretación de los resultados y aplicación de los modelos desarrollados al procedimientos de Cribado Virtual Basado en Ligandos (LBVS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el desarrollo de cualquier estudio QSAR, es un ciclo iterativo.

1.4.1. Descriptores Moleculares.

Los descriptores moleculares (DMs) juegan un papel fundamental en el desarrollo de la Química, las Ciencias Farmacéuticas y las investigaciones de nuevos materiales (Todeschini and Consonni, 2009).

Los DMs son representaciones matemáticamente formales de las moléculas (u otras entidades químicas) y son obtenidos al aplicar un algoritmo definido sobre una determinada representación molecular.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

En la literatura se pueden encontrar definiciones del concepto de DMs, como la que aparece a continuación:

“El descriptor molecular es el resultado final de un procedimiento matemático que transforma la información química codificada con una representación simbólica de una molécula en un número (o conjunto de ellos) de utilidad.”(Todeschini and Consonni, 2009)

Los descriptores moleculares pueden ser agrupados inicialmente en dos clases generales:

1) Los derivados de medidas experimentales como: logaritmo de partición 1-octanol/agua, refractividad molar, momento dipolo, polarizabilidad y otras propiedades químico-físicas en general (Martínez-Santiago et al., 2014).

2) Descriptores Moleculares Teóricos, los cuales son derivados de representaciones simbólicas de las moléculas y estos a su vez pueden ser clasificados acorde con diferentes formas de representación molecular (Martínez-Santiago et al., 2014).

1.4.2. Métodos Estadísticos.

1.4.2.1. Los Métodos Quimiométricos en los estudios QSAR

El término *quimiometría* surgió en la década del 70 y se define como la disciplina química que combina herramientas matemáticas y estadísticas con procedimientos para el análisis e interpretación de los datos químicos (Brereton, 1990, Van de Waterbeemd, 1995b). Estas técnicas son utilizadas para la recopilación, elaboración, análisis, reducción y la caracterización de conjuntos grandes de datos, como los que se utilizan en los estudios quimiométricos y bioinformáticos (Van de Waterbeemd, 1995b). Actualmente las técnicas de análisis quimiométrico se interceptan no solo con varios campos de la Matemática y la Estadística clásica sino también de la Inteligencia Artificial y otras ramas de la ciencia de la computación (Vapnik, 1995). A continuación serán descritos algunos aspectos importantes del método de regresión lineal múltiple (RLM).

1.4.2.2. Regresión lineal múltiple.

La RLM estudia las relaciones entre una variable dependiente y un conjunto de variables independientes. Así mismo, la regresión múltiple remite a la correlación múltiple, que se representa por R. Es decir, la correlación múltiple analiza la relación entre una serie de variables independientes o predictores (X_1, X_2, \dots, X_k), considerados conjuntamente, con una variable dependiente o criterio. Sus fundamentos se hallan en la correlación de Pearson (Alzina, 1989). La recta de regresión múltiple tiene la siguiente forma:

$$y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_k X_k \quad (1.1)$$

Siendo: “a” un valor constante, y la variable dependiente, X_1, X_2, \dots, X_n variables predictoras y b_1, b_2, \dots, b_n coeficientes estimados para cada variable independiente del modelo.

Como puede observarse, la RLM puede utilizarse en la predicción de los valores de la variable dependiente, en base a una combinación lineal de variables independientes (Frank and Friedman, 1993).

Algoritmo Genético (AG) como método de selección de parámetros

Cuando se habla de algoritmos genéticos hay que mencionar a John Holland que en 1975 sienta las bases para sus posteriores desarrollos hasta llegar a lo que se conoce hoy por algoritmos genéticos actuales. Según D. Goldberg los AGs son:

Algoritmos de búsqueda basados en los mecanismos de selección natural y genética natural. Combinan la supervivencia de los más compatibles entre las estructuras de cadenas, con una estructura de información ya aleatorizada, intercambiada para construir un algoritmo de búsqueda con algunas de las capacidades de innovación de la búsqueda humana (Goldberg, 1989).

Un AG no es más que un método de búsqueda que imita la teoría de la evolución biológica de C. Darwin (1809-1882) para la resolución de problemas. Para ello, se parte de una población inicial de la cual se seleccionan los individuos más capacitados para luego reproducirlos y mutarlos, y de esa forma obtener finalmente la siguiente generación de

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

individuos que estarán más adaptados que la anterior generación (Leardi, 2001) (Leardi, 1994).

En la naturaleza todo el proceso de evolución biológica se hace de forma natural, pero para aplicar el AG al campo de la resolución de problemas habrá que seguir una serie de pasos. Como premisa se debe conseguir que el tamaño de la población sea lo suficientemente grande para garantizar la diversidad de soluciones. Se aconseja que la población sea generada de forma aleatoria para obtener dicha diversidad.

Los pasos básicos de un algoritmo genético son (Goldberg, 1989) (Leardi, 2001):

- Evaluar la puntuación de cada uno de los cromosomas generados.
- Permitir la reproducción de los cromosomas siendo los más aptos los que tengan más probabilidad de reproducirse.
- Con cierta probabilidad de mutación, mutar un gen del nuevo individuo generado.
- Organizar la nueva población.

Estos pasos se repetirán hasta que se dé una condición de terminación. Se puede fijar un número máximo de iteraciones antes de finalizar el algoritmo genético o detenerlo cuando no se produzcan más cambios en la población (convergencia del algoritmo). Esta última opción suele ser la más habitual.

Validación Interna de modelos

Una condición necesaria para que sea válido un modelo de regresión es que el *coeficiente de determinación (R^2)* esté cercano, tanto como sea posible, a uno y que *el error estándar estimado (s)* sea pequeño (*capacidad de ajuste a los datos*); sin embargo la consideración de estos únicos parámetros estadísticos no es suficiente, pues los valores de los mismos no necesariamente están relacionados con la capacidad del modelo de realizar buenas predicciones de una data futura (Todeschini and Consonni, 2009). Las técnicas de validación constituyen herramientas fundamentales a la hora de evaluar la capacidad predictiva de los modelos obtenidos por métodos multivariados de regresión y clasificación, por lo que son extensamente aplicadas en la mayoría de los estudios QSPR/QSAR.

La *validación cruzada* (VC) opera haciendo un número de reducidas modificaciones al conjunto de compuestos de la data original y entonces calcula la precisión de las

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

predicciones de cada uno de los resultados de los modelos (Wold, 1978). Es decir, se ajusta el modelo a los nuevos datos, dejando la parte omitida fuera, y estos se evalúan en el modelo para computar las predicciones de los casos que fueron excluidos. Este procedimiento se repite para cada conjunto de datos modificados. El *poder predictivo del modelo* puede expresarse como q^2 , denominado como la ‘varianza predictiva’ o la ‘varianza de la validación cruzada’, la cual es igual a $(1 - \text{PRESS}/\text{SS}_Y)$, o sea que puede ser calculado acorde a la siguiente ecuación:

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (1.2)$$

donde, y_i , \hat{y}_i y \bar{y} es la respuesta observada, estimada y media del *i-ésimo* caso, respectivamente. Cuando se utiliza un solo compuesto en cada grupo de VC (lo cual da N grupos), el procedimiento se conoce como *dejar “uno” fuera* (LOO, acrónimo de **Leave-One-Out**).

No obstante, se ha mostrado que desde el punto de vista teórico y práctico, el procedimiento de *dejar ‘varios’ fuera* (LSO, acrónimo de **Leave-Several-Out**) es preferible al LOO (Shao, 1993).

En la técnica de validación por **Bootstrap**, la talla original del conjunto de datos (n) es preservada en la serie de entrenamiento, a partir de la cual se seleccionan m objetos ($n > m$) que son asignados al conjunto de evaluación y estos son sustituidos por m objetos repetidos de la serie de entrenamiento (Efron, 1982). El modelo es calculado en el conjunto de entrenamiento y las respuestas son predichas en el conjunto de evaluación. Las diferencias de los cuadrados entre las respuestas ciertas y las predichas son recogidas en el PRESS. Este procedimiento de elaboración del conjunto de entrenamiento es repetido miles de veces, los PRESS son sumados y el poder predictivo promedio es calculado (Wehrens et al., 2000). El método del revuelto [prueba de aleatoriedad (**y-sc: y-scrambling**)] es empleado para evaluar la correlación al azar (Wold and Erikson, 1995). En esta técnica, se calcula un modelo de regresión lineal para la verdadera variable respuesta (y) junto con un número de regresiones repetidas (200-300 veces) con las

mismas variables, pero con la variable dependiente aleatoriamente revuelta (\tilde{y}). Luego se calcula para cada modelo la varianza explicada q^2_{LOO} , y se evalúa la correlación entre la respuesta verdadera y la revuelta de la siguiente manera:

$$q_k^2 = a + b \cdot r_k(y, \tilde{y}_k) \quad (1.3)$$

donde, la q_k^2 es la varianza explicada para el modelo obtenido con los mismos predictores teniendo el k -ésimo vector revuelto, r_k es la correlación entre los vectores para la respuesta verdadera y la k -ésima revuelta. Un valor del intercepto cercano a cero implica que el modelo no es obtenido al azar mientras que un intercepto grande indica que los modelos aleatorios poseen el mismo desempeño que el modelo verdadero, por lo que se pudiera considerar aleatorio (Rücker et al., 2007).

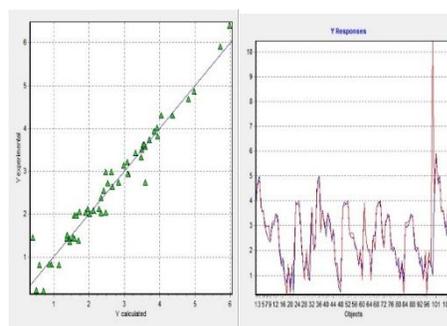
1.4.3. Estudios Computacionales con saponinas esteroideas derivadas de la planta *Agave brittoniana* Trel

Se han realizado estudios previos de modelación QSPR empleando las saponinas y sapogeninas esteroideas derivadas de la planta *Agave brittoniana* Trel, realizados por el grupo de investigación de productos naturales de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas (Vázquez, 2017).

$$\begin{aligned} \log P = & 8.6638(\pm 0.3211) + 0.1559(\pm 0.0073) \left[\frac{W}{Tn} ES(G) \right]_M^{C-\frac{D}{7}} \\ & - 0.0339(\pm 0.0017) \left[\frac{V7}{Tn} GI_6(N_2) \right]_M^{C-\frac{D}{7}} - 0.0507(\pm 0.0025) \left[\frac{V12}{Tn} AC_4(V) \right]_M^{C-\frac{D}{7}} \\ & + 0.0023(\pm 0.0003) \left[\frac{W}{Tn} ES(N_1) \right]_Q^{C-\frac{D}{7}} - 0.0005(\pm 0.00004) \left[\frac{T}{Tn} GI_3(P_3) \right]_Q^{C-\frac{D}{7}} \\ & + 0.0096(\pm 0.0009) \left[\frac{V17}{Tn} ES(N_2) \right]_M^{C-\frac{D}{7}} + 0.0003(\pm 0.0001) \left[\frac{V4}{In} MN \right]_B^{M-\frac{D}{7}} \end{aligned}$$

$$R^2=96.52 \quad q^2_{\text{loo}}=95.57 \quad q^2_{\text{boot}}=94.76 \quad s=0.2533 \quad F=317.43$$

(a)



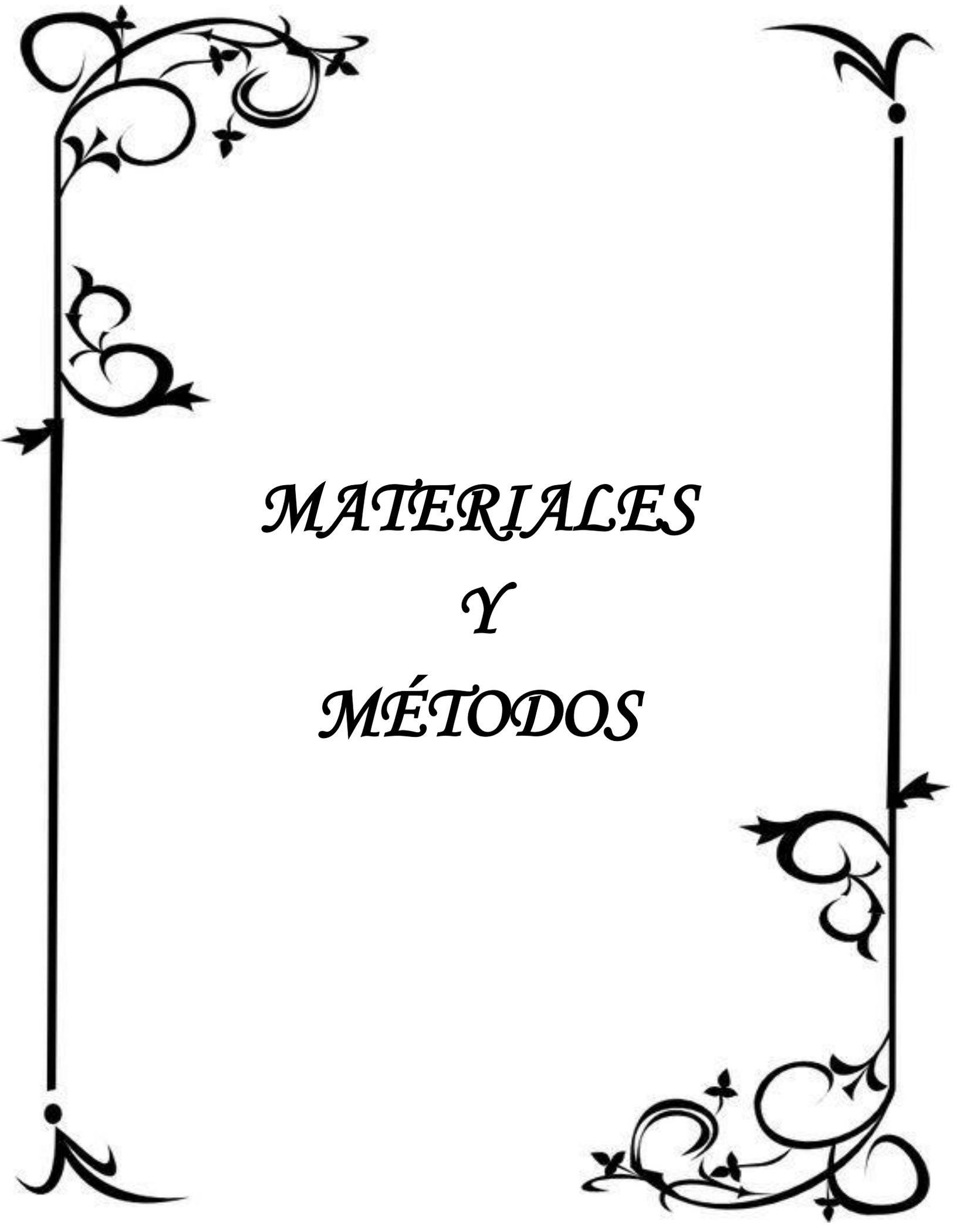
(b)

Figura 3. (a) Modelo QSPR empleando las saponinas y sapogeninas esteroideas, (b) gráficos de predicción y correlación

Se comprobó que el modelo de RLM (Figura 3) posee un elevado poder predictivo que correlaciona satisfactoriamente las estructuras con sus respectivos log P (logaritmo de partición 1-octanol/agua), ya que es una propiedad químico-física de importante relación con la estructura espacial de la molécula y su desempeño como sustancia biológicamente

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

activa, llegando a la conclusión que las moléculas que mejor se absorben en el intestino delgado son las prosapogeninas y sapogeninas esteroidales que presentan mayor log P o sea que la absorción de los compuestos va aumentando a medida que se van eliminando los grupos azúcares.



MATERIALES

Y

MÉTODOS

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Modelación QSAR

2.1.1. Conformación de la base de datos

Con el objetivo de recopilar la mayor cantidad de casos (moléculas) posibles y que además se pudiera confiar en la veracidad de la fuente de información, en el presente estudio se realizó una búsqueda en la Base de Datos especializada PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), sistema que está operado y mantenido por el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Para desarrollar el estudio QSAR recopilamos ensayos en los cuales se reportaban compuestos con diferente grado de inhibición de la enzima ADAM-17; se emplearon solo aquellos ensayos que reportaban valores de IC₅₀ (concentración requerida para inhibir el 50% del ADAM-17) unificando los valores expresados en micromolar (μM).

La base de datos quedó conformada por un total de 390 moléculas con valores de IC₅₀ entre valores de 100 y 0,0001 μM por lo que fue necesario linealizarlos empleando la función de $\log\left(\frac{1}{IC_{50}}\right)$ para la modelación QSAR.

Además, se conformó una serie de predicción con las sapogeninas esteroidales derivadas del extracto n-butanólico de la planta *Agave brittoniana* Trel. para realizar el cribado de las mismas con el objetivo de predecir su posible actividad inhibitoria.

Se empleó el programa ChemDraw Ultra 8.0 del paquete computacional ChemOffice para representar las estructuras de la base de datos obtenidas del PubChem y las sapogeninas esteroidales, para ser empleadas en la modelación QSAR. Estas representaciones estructurales se guardaron en formato de archivo con extensión .mol (es una opción del ChemDraw) que contiene la información sobre el número de átomos de la molécula y de los enlaces entre cada par de átomo (o en otras palabras cómo están conectados los átomos en la molécula). Se optimizaron las estructuras de las moléculas representadas empleando el método semiempírico AM1 (Austin Model 1 en sus siglas en inglés) para obtener las estructuras de menor energía.

2.1.2. Parametrización cuantitativa de la estructura molecular

Fueron calculados los descriptores moleculares empleando el software DRAGON que incluye a los Descriptores Constitucionales (0D); descriptores unidimensionales (1D) como Conteo de Grupos Funcionales y Fragmentos Centrados en átomos; descriptores bidimensionales (2D) como los Descriptores Topológicos, Conteo del Camino Molecular, Índices de conectividad, Índices de información, Autocorrelaciones 2D, Índices Topológicos de Carga, Índices basados en autovalores, entre otros; descriptores tridimensionales (3D) como los Perfiles Moleculares de Randic, Descriptores Geométricos, RDF, 3D-MoRSE, WHIM y GETAWAY; y otros como los Descriptores de carga y Propiedades moleculares.

2.1.3. Generación de modelos

2.1.3.1. Separación de las series de entrenamiento y predicción

Para diseñar las series de entrenamiento (empleada para construir el modelo) y de predicción (empleada para evaluar el modelo) se aplicó el método de Análisis de Conglomerados, implementado en el paquete STATISTICA. La medida de disimilitud y agente disgregante/aglomerante, fue el Cuadrado de la Distancia Euclidiana. Se tomó el 25% de cada uno de los clústeres para la confección de la serie de predicción, mientras que el resto de los compuestos formó parte de la serie de entrenamiento.

Los modelos de regresión QSAR se obtuvieron con el programa MobyDigs (versión 1.0 – 2004) (Todeschini et al., 2004). Los pesos de cada descriptor en la ecuación de regresión son determinados por el método de mínimos cuadrados. Este programa utiliza un Algoritmo Genético como método de selección de parámetros. En el estudio QSAR se determinó el tamaño (grado de libertad) deseado para los modelos a generar. Se optimizaron los modelos usando como función objetivo (función de optimización) del algoritmo genético el estadístico q^2_{LOO} y se validaron empleando las técnicas de remuestreo [*bootstrapping* (q^2_{boot})] y revuelto [*Y-scrambling*: a (R^2), a (q^2)].

2.1.3.2. Identificación de *outliers*

Un paso crucial en la construcción de modelos es la detección de compuestos atípicos (“*outliers*”), que se definen como puntos que no se ajustan o son pobremente predichos;

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

afectando así los parámetros estadísticos. Es decir, la identificación de los *outliers* busca un mejoramiento cualitativo del modelo, y, aunque no es necesario justificar la extracción de estos puntos, se recomienda determinar la razón para su peculiaridad en aquellos casos en que sea posible.

Existen varias técnicas para detectar la presencia de *outliers*, tales como: los análisis de los residuales estandarizados, los residuales *studentizados*, el método de *Leverage*, la estadística DFITS, la distancia de Cook y el método de “dejar varios fuera”. En el presente trabajo se emplearon los gráficos de William, considerando el *leverage* y los residuos estandarizados para la detección de *outliers*.

2.2. Obtención de extractos y fracciones derivados de hojas de *Agave brittoniana* Trel

2.2.1. Equipos principales

- Estufa (Binder, Modelo: EB0386903, EEUU)
- Molino de cuchillas (IKA® -MF 10 basic, Alemania)
- Balanza técnica (Sartorius Modelo: BS2202S, Alemania)
- Balanza técnica digital (Sartorius, Modelo: BS2202S, Alemania)
- Rotoevaporador (IKA® Modelo: RV10BS1, Alemania)
- Autoclave (SAKURA, Japón)
- Plancha de calentamiento (IKA, C-MAG HP7, Alemania)

2.2.2. Reactivos empleados

Todos los disolventes (n-butanol 98.9%, n-hexano 99%, acetato de etilo 99% y etanol 70%) y reactivos utilizados son de las firmas MERCK y Panreac.

2.2.3. Técnicas cromatográficas.

Cromatografía de columna sobre fase normal utilizando como fase estacionaria Sílica-gel (SiO₂) con granulometrías de 70-230 mesh.

Cromatografía de capa delgada (CCD) sobre placas cromatográficas (soporte de aluminio) y sílica-gel 60F254 (fase normal).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.4. Recolección, identificación y selección del material vegetal

Las hojas de *Agave brittoniana* Tel. fueron recolectadas en horas de la mañana en áreas de la zona protegida Cubanacán, aledaña a la ciudad de Santa Clara, en los meses comprendidos entre enero y febrero del 2018. El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Orgánica del departamento de Licenciatura en Química de la Facultad de Química-Farmacia, UCLV, y lavado con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr.C. Idelfonso Castañeda Noa, especialista del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en la citada institución, bajo el número de serie HPVC # 5445. Se seleccionaron hojas sanas, sin daño mecánico, químico o microbiológico visible.

2.2.5. Preparación del material vegetal

Cada hoja de la planta se cortó en pequeños pedazos, retirándole la corteza, luego se secó mediante calor artificial utilizando estufa Binder (USA) a 50°C, extendiendo estos pequeños pedazos en toda la superficie de la estufa. Las hojas se secaron durante 10 días hasta obtener un peso constante, para luego ser molinadas en un molino de cuchillas con una apertura de malla de 3 mm marca KMf 10 basic .IKA^RWERKE, logrando obtener un polvo fino.

A la droga seca y molinada se le determinó el contenido de humedad residual para verificar que se encuentra dentro del rango permisible según la Norma Ramal de Salud Pública # 309.

2.2.6. Obtención del extracto hidroalcohólico

Se pesó una masa de 200,00 g del material vegetal previamente molinado. Esta masa fue macerada empleando un volumen de 1 L de etanol al 70 % durante 96 horas en un lugar seco y sin entrada de luz solar. Luego se decantó el líquido sobrenadante y se filtró adecuadamente, este proceso fue realizado cuatro veces. La cantidad de maceraciones se determinó extrayendo una alícuota por triplicado de cada una de las decantaciones para determinar la masa extraída.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Este extracto fue rotoevaporado a una temperatura de 40°C, se determinó el porcentaje de humedad y seguidamente se guardó en frío alejado de la luz solar.

2.2.7. Obtención del extracto n-butanólico

Se pesó una masa de 82,45 g del extracto hidroalcohólico seco previamente obtenido y se suspendió en un volumen de 500 mL de agua destilada. Posteriormente se añadió el mismo volumen de n-butanol realizando cinco extracciones. La cantidad de extracciones se determinó extrayendo una alícuota por triplicado de cada una de las mismas para determinar la masa extraída.

2.2.8. Obtención de saponinas esteroideas

2.2.8.1. Hidrólisis ácida. Comprobación de la obtención de crudo de saponinas

Se pesó una masa de 16,85 g del extracto n-butanólico, y se disolvió en 120 mL de etanol al 70 % y 120 mL de HCl 2 mol/L (relación 1:1 y se calentó hasta ebullición durante tres horas).

Se extrajeron 3 mL cada veinte minutos del proceso de hidrólisis durante tres horas. Estas alícuotas se enfriaron y neutralizaron con gotas de hidróxido de sodio para posteriormente comprobar la obtención del crudo de saponinas a través de la realización de la prueba de la espuma, la prueba de hemólisis y la determinación de azúcares reductores. La ausencia de saponinas corroboraría la totalidad de la hidrólisis en el crudo inicial de saponinas (extracto n-butanólico).

Prueba de la Espuma: Se tomó una alícuota del hidrolizado y se le adicionó agua destilada, se agitó y se observó si se producía espuma persistente (Bruneton, 2001).

Prueba de Hemólisis: Se utilizó la técnica descrita por González y colaboradores (González et al., 2009), con adaptaciones, pues en este caso el objetivo del ensayo es cualitativo. Se emplearon eritrocitos de rata Wistar macho de 8 semanas de edad proveniente de Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB). El contenido de las muestras fue preparado a partir de 1750 μ L de PBS (buffer salino fosfatado isotónico), 50 μ L de suspensión eritrocítica y 200 μ L de cada hidrolizado, para garantizar

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

una concentración de 1mg/mL al igual que el control positivo de hemólisis, el dodecilsulfato de sodio (SDS). La hemólisis se detectó a 540 nm contra blanco de eritrocitos en PBS (hemólisis espontánea). El resultado positivo se mostró con signo +.

Prueba de Fehling: El ensayo se realiza empleando el reactivo de Fehling, la técnica para este ensayo se encuentra en la literatura básica y se realizó de forma cualitativa. Se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído, éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el reactivo de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor. Una coloración verde en la muestra indica concentraciones bajas de azúcares reductores, en cambio, un color rojo ladrillo se refiere a concentraciones más elevadas (Bruneton, 2001).

2.2.8.2. Obtención de la fracción de acetato de etilo

A la muestra obtenida en el proceso de hidrólisis se le realizaron extracciones sucesivas con acetato de etilo y agua (relación 1:1) para lograr que las sapogeninas pasaran a la fase orgánica. Esto se comprobó mediante el uso de una placa cromatográfica empleando como fase móvil acetato de etilo/n-hexano (relación 1:1) y posteriormente revelando con H₂SO₄ al 50%.

2.2.9. Fraccionamiento del crudo de sapogeninas

Para la realización de la columna cromatográfica se escogió como fase estacionaria sílica-gel fase normal, marca Sephadex. La columna se preparó por vía húmeda, añadiendo cuidadosamente en la columna de vidrio la sílica-gel suspendida en el disolvente de elución (n-hexano/acetato de etilo en las proporciones 1:1 y 1:2). Se cuidó la uniformidad del lecho, para que no se formaran burbujas. Para su aplicación a la columna se adicionaron 2,00 g de la muestra en seco.

Las fracciones fueron recolectadas en frascos de igual tipo, se reguló el tiempo de goteo de la columna así como la cantidad de gotas en cada frasco para lograr el mismo volumen en cada fracción. La comprobación de la separación de la columna se realizó por CCD

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

fase normal utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano/acetato de etilo en relación 1:1 y el revelador utilizado fue H₂SO₄ 50%.

2.3. Evaluación farmacológica de la actividad antiinflamatoria

En este epígrafe se explicará el procedimiento realizado en la evaluación farmacológica de la fracción rica en yucagenina en modelo crónico de granuloma inducido por pellet de algodón. Se utilizaron ratas *Sprague Dawley*, machos, de peso corporal 180 a 220 g provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), sometidas a condiciones de alimentación convencional, agua *ad libitum*, así como ciclo de luz/oscuridad de 12/12, temperatura ambiente de 20 ± 2°C y humedad controlada de 50 % a 70 %. Los animales y el alimento fueron recibidos con los respectivos certificados de calidad (Anexos 2 y 3).

Se empleó la técnica descrita por Sheth, posteriormente actualizada por otros investigadores (Mahat and Patil, 2007, Sanmugapriya et al., 2005). Previo a la realización del experimento, los discos de algodón se pesaron y se esterilizaron en autoclave. Los animales se anestesiaron con ketamina y se les realizaron incisiones de 2 cm en la región interescapular de cada animal, se decoló la piel y pellets de algodón fueron introducidos subcutáneamente y de manera bilateral en la región decolada. Posteriormente se realizó la sutura, la limpieza de la herida y se aplicó tópicamente penicilina procaínica para la prevención de la sepsis postquirúrgica.

Al día siguiente los grupos I, II y III correspondientes a fracción rica en yucagenina (FRY), diosgenina (D) y crudo de saponinas (CS) recibieron dosis de 20, 20, y 50 mg/kg respectivamente. El grupo IV (control negativo) recibió agua destilada (10 mL/kg) y el grupo V (control positivo) recibió solución de indometacina (5 mg/kg). La administración a todos los grupos se realizó sobre la base del peso vivo a razón de 10 mL/kg y por vía oral a través de cánulas intragástricas (16 G). Esta aplicación se realizó diariamente durante 7 días y al octavo día se sacrificaron los animales por dislocación cervical, teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio (Sanmugapriya et al., 2005, Mahat and Patil, 2007).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Los granulomas formados fueron extraídos y pesados en balanza analítica para determinar su peso húmedo. Posteriormente se secaron en el horno durante dos horas a 60°C y se pesaron nuevamente para determinar su peso seco.

El valor del peso húmedo nos indica acción a nivel del edema en la inflamación, y el valor del contenido del peso seco se refiere a la cantidad de tejido fibrogranulomatoso (proceso crónico de la inflamación).

Los cálculos se realizaron utilizando las siguientes fórmulas:

$$P_H = P_G - P_C \qquad P_S = P_{Gdesc} - P_C \qquad C_{ac} = P_H - P_S$$
$$C_{FG} = P_S - P_{Palg}$$

Donde:

P_H = Peso húmedo	P_G = Peso del granuloma
P_S = Peso seco	P_{Gdesc} = Peso del granuloma desecado
C_{FG} = Contenido fibrogranuloso	P_{Palg} = Peso del pellet de algodón
P_C = Peso de la cápsula	C_{ac} = Contenido acuoso

El porcentaje de inflamación fue determinado tomando como referencia el peso del granuloma antes de su inserción en el animal.

$$\%iInf FC = \frac{X_f - X_o}{X_o} \cdot 100 \qquad (2.1)$$

Donde:

$\%iInf FC$ = porcentaje de inflamación en la fase crónica

X_o = peso inicial del granuloma

X_f = peso final del granuloma (seco/húmedo)

El porcentaje de inhibición, tanto en el contenido acuoso como en el fibrogranuloso, se expresó tomando como referencia el peso del granuloma formado en el grupo control. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\%iInf FC = \frac{X_{control} - X_{problema}}{X_{problema}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Donde:

$\%iInf FC$ = porcentaje de inhibición de la inflamación en la fase crónica

$X_{control}$ = valor medio del porcentaje de inflamación en el grupo control

$X_{problema}$ = valor medio del porcentaje de inflamación en el grupo problema

2.3.1. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados por el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 22.0. Se determinó la media y desviación *standard* de los parámetros evaluados para cada grupo experimental. Previo al análisis de las diferencias entre los parámetros obtenidos en cada grupo experimental, se realizó el test de Shapiro-Wilk para comprobar el tipo de distribución de las muestras con un intervalo de confianza del 95 %.

2.3.2. Aspectos éticos y de bioseguridad

Todos los experimentos fueron ejecutados cumpliendo los requisitos descritos en el Manual de Bioseguridad del UTEX, que implican la correcta manipulación de las muestras y desechos biológicos. El uso de los implementos de seguridad para el investigador, así como la ejecución de las pruebas en lugares idóneos, que garantizaron no solo la calidad de la investigación, sino también la protección del personal y del medio ambiente. Se observó el cumplimiento de los principios éticos en la experimentación animal, referente a mantener el bienestar de los animales durante el ensayo y se aplicaron los métodos aceptados para la ejecución de las técnicas que implique abordaje invasivo del animal. Cuando concluyó el estudio se procedió al sacrificio por métodos aceptados que no causaron dolor ni sufrimiento al animal. (Sobredosis de anestésico, seguido de dislocación cervical).



*RESULTADOS y
DISCUSIÓN*

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Modelación QSAR

3.1.1. Parametrización cuantitativa de la estructura molecular

El cálculo de los descriptores moleculares se realizó utilizando la versión 5.5 del software DRAGON. Como resultados se obtuvo un total de 1721 DMs de 0-3D calculados para todas las moléculas objeto de estudio, los cuales posteriormente pasaron a ser las variables a utilizar en la obtención de los modelos.

3.1.2. Generación de modelos QSAR

3.1.2.1. Separación de la serie de entrenamiento y la serie de predicción

Con el fin de utilizar un grupo de compuestos para evaluar el poder predictivo (validación externa); fue necesario dividir la base de datos, para que éstos no fueran utilizados en la generación de los modelos. La división fue aleatoria y racional, empleando primeramente, para la separación en clústeres, el método de Análisis de Conglomerados (AC). Finalmente la serie de entrenamiento fue conformada por 299 moléculas y la serie de predicción compuesta por 91 moléculas. Se debe destacar que la condición necesaria y suficiente para asegurar el poder predictivo de un modelo es el análisis de los estadísticos para una serie de predicción externa.

3.1.2.2. Identificación de *outliers*

Durante el desarrollo de los modelos fueron identificados en total 21 compuestos *outliers* debido a su alto valor de residual estándar y su alto valor de *leverage*. La eliminación de estos compuestos significó un mejoramiento significativo en los estadísticos de los modelos de RLM; empleándose finalmente una base de datos de 369 moléculas, la serie de entrenamiento quedó conformada por 283 compuestos y la serie de predicción compuesta por 86 compuestos. Si se tiene en cuenta que el porcentaje comúnmente aceptado de *outliers* es de menos del 10% de toda la base de datos y que el porcentaje de este tipo de compuestos para nuestros modelos fue de 5,38 %; entonces se puede decir que la extracción de *outliers* en nuestro estudio está dentro de los parámetros establecidos en la literatura.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.2.3. Mejores modelos y selección del modelo final.

A continuación se representan los mejores modelos de siete variables (Tabla 1) junto a sus parámetros estadísticos. Los mismos se encuentran ordenados por el valor del coeficiente de determinación en orden creciente.

Tabla 1. Mejores modelos QSAR obtenidos

Modelo	Variables	R ²	Q ²	Q ² _{boot}	Q ² _{ext}	F	s
1	IC4 nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	61,37	59,21	58,62	48,57	73,07	0,57
2	SIC5 nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	63,57	61,61	61,08	50,37	80,27	0,56
3	SIC4 ATS6m nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	65,05	62,74	61,98	49,14	73,14	0,55
4	SIC5 ATS6m nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	65,10	62,81	62,02	49,52	73,29	0,54
5	nR07 SIC4 nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	65,57	63,33	62,60	51,92	74,82	0,54
6	nR07 SIC5 nOHs nOHt B05[N-N] F07[C-N] F09[C-Br]	65,66	63,43	62,76	52,22	75,11	0,54

Al analizar los parámetros estadísticos mostrados en la tabla 1 se observa que todos los modelos son capaces de describir más del 60 % de la varianza experimental de los valores experimentales de inhibición de la enzima ADAM-17; además se observa una buena correlación entre el valor experimental y el valor predicho por los mismos. Todos los modelos mostraron robustez y estabilidad en el proceso de validación interna; un prueba de esto es que la diferencia entre el coeficiente de determinación (R²) y el coeficiente de validación interna (Q²_{boot}) fue menor que el 5 % para todos ellos. El poder predictivo está por encima del 50 % para tres de los seis modelos, lo mejores, y aunque los otros se quedaron por debajo, su valor de predicción estuvo muy cercano al valor exigido. Después de analizar todos los valores estadísticos se elige el modelo seis como el modelo final, a continuación se presenta la ecuación de dicho modelo (ecuación 3.1) donde puede verse la mejor combinación de variables que describen el mecanismo de inhibición de la enzima ADAM-17.

Ecuación del mejor modelo:

$$\begin{aligned}
 IC_{50} = & 5,70(\pm 1.07) - 0,65(\pm 0.16)[\mathbf{nR07}] - 6.22(\pm 1.18)[\mathbf{SIC5}] & (3.1) \\
 & + 1.37(\pm 0.13)[\mathbf{nOHs}] - 1.98(\pm 0.17)[\mathbf{nOHt}] \\
 & + 0.74(\pm 0.08)\mathbf{B05}[N - N] - 0.10(\pm 0.01)\mathbf{F07}[C - N] \\
 & - 0.53(\pm 0.07)[\mathbf{F09}[C - Br]]
 \end{aligned}$$

R² = 65.66 Q² = 63.43 Q²_{boot} = 62.76 Q²_{ext} = 52.22 F = 75.11 s = 0.54
P < 0,0001 SDEP = 0.549 a(R²) = 0.005 a(Q²) = -0.055

Donde: N es el número de compuestos empleados para entrenar el modelo, R² es el coeficiente de determinación; mientras que s es la desviación estándar del modelo. Los estadísticos Q² y s se corresponden al proceso de validación interna o cruzada LOO que fue mayor de un 65 %, además el valor de SDEP fue 0.549 correspondiente al error estándar de la predicción. Estos resultados indican que nuestro modelo muestra robustez y estabilidad teniendo en cuenta la complejidad de la base de datos empleadas así como su diversidad estructural. Además, los parámetros resultantes del experimento *Y-scrambling* para este modelo fueron a(R²) = 0,005 y a(q²) = -0,055; el hecho de sean valores bajos demuestra que el modelo no es producto de una correlación casual. En la tabla 2 se muestran algunos de los resultados obtenidos para la serie de entrenamiento y la serie de predicción.

En la figura 4 se muestra el gráfico de regresión para los valores predichos por la ecuación del modelo contra los valores experimentales para las series de entrenamiento (triángulos verdes) y la serie de predicción (triángulos azules). Como puede observarse, la gran mayoría de los puntos se encuentran distribuidos en las cercanías de la recta, mostrando una buena correlación entre el valor observado y el predicho. Esto, unido a los estadísticos de la serie de predicción, nos brinda una medida de la posibilidad de la aplicación del modelo para la predicción de las IC₅₀ de la serie de las sapogeninas esteroidales en un cribado virtual.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Valores experimentales y predichos del $\log(1/IC_{50})$ para una muestra de las series de entrenamiento (*Training*) y predicción (*Test*)

ID	Serie	Experimental	Predicho	Error de la predicción
1	Training	-0,38	-0,15	0,23
2	Training	0,20	0,15	-0,04
3	Test	0,94	-0,58	-1,52
4	Training	1,00	0,32	-0,68
5	Training	1,00	0,06	-0,94
6	Training	0,04	0,07	0,03
7	Training	0,48	0,17	-0,31
8	Test	0,48	0,08	-0,39
9	Test	0,48	0,27	-0,21
10	Training	0,42	-0,21	-0,63
11	Training	0,68	0,04	-0,64
12	Training	0,23	-0,10	-0,33
13	Training	1,00	0,11	-0,89
14	Training	1,00	-0,22	-1,22
15	Training	-0,08	-0,45	-0,38
16	Training	0,70	-0,05	-0,74
17	Training	0,83	-0,29	-1,12
18	Test	0,96	-0,49	-1,45
19	Training	0,19	-0,09	-0,29
20	Training	0,18	0,12	-0,05
21	Test	0,38	1,44	1,06
22	Training	0,48	0,15	-0,33
24	Training	0,15	0,25	0,11
25	Training	0,11	0,17	0,05
26	Training	0,26	0,39	0,13
27	Training	0,81	0,24	-0,58
28	Training	0,08	0,21	0,13
29	Test	0,20	0,15	-0,06
30	Training	0,58	0,08	-0,50

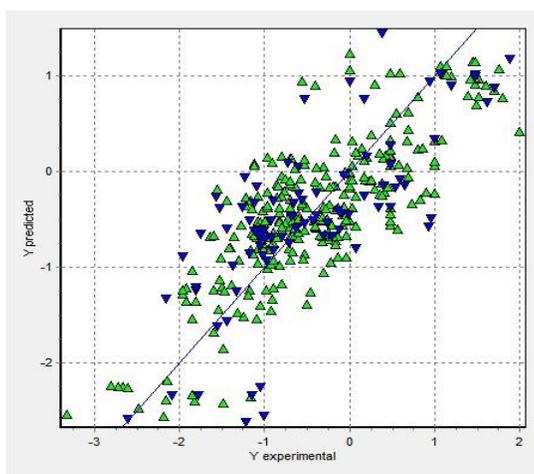


Figura 4. Gráfico de regresión QSAR para la serie de entrenamiento (triángulos verdes) y la serie de predicción (triángulos azules)

Un aspecto crucial en los estudios quimiométricos y QSAR es la definición del Dominio de Aplicación (DA) de un modelo, sea de clasificación o de regresión. Se consideran fiables las predicciones para los compuestos que caen dentro del DA para un universo de compuestos químicos; incluso si el modelo QSAR es robusto, significativo y validado no pueden esperarse predicciones fiables de la propiedad modelada si no se cumple con esta especificidad (Gramatica, 2007). En este caso, para visualizar el DA de un modelo QSAR, se emplean los gráficos de Williams (Figura 5) donde se grafican los valores de *leverage* (h) contra los residuos estandarizados (Std.Res. o σ) para el modelo final. Como puede verse, la mayoría de los compuestos se encuentran dentro del DA, área comprendida entre ± 3 desviaciones estándar y a la izquierda de 0.085 (valor del *leverage crítico*). Solo unos pocos compuestos del conjunto de entrenamiento mostraron valores de h mayores que el *leverage crítico*, aunque mostraron valores de desviación estándar dentro de los límites, lo que significa que se los podría considerar como compuestos influyentes en lugar de valores atípicos. Por lo tanto, se puede decir que el modelo, dentro de su dominio de aplicación, puede ser usado con gran precisión.

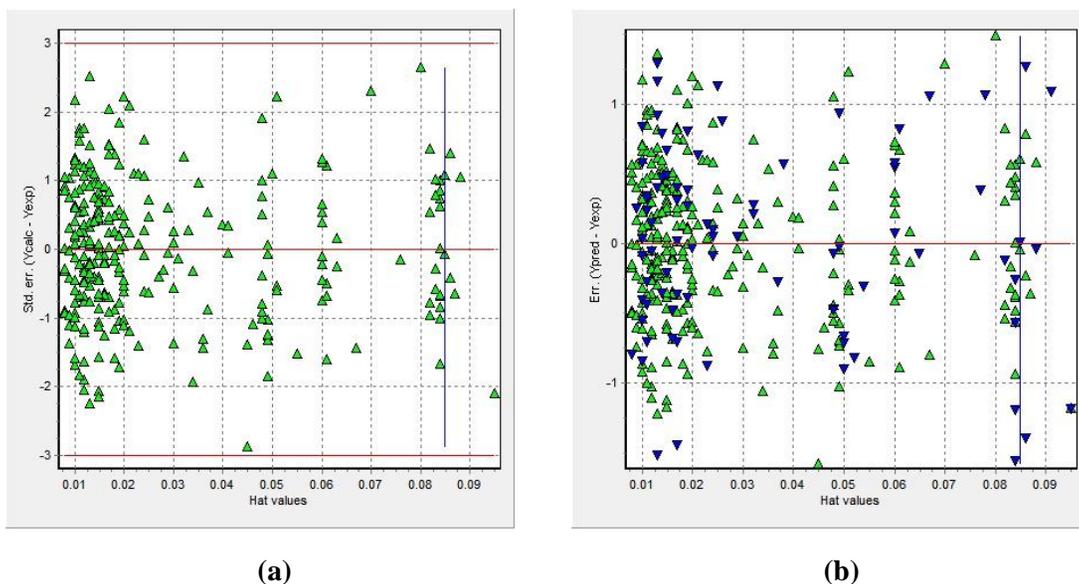


Figura 5. Gráficos de Williams para las series de enteramiento (triángulos verdes) (a) y predicción (triángulos azules) (b)

3.1.3. Cribado virtual de las sapogeninas esteroidales

Se conoce por estudios previos (Guerra de León, 2005) las estructuras de las sapogeninas presentes en el extracto de la planta *Agave brittoniana* Trel. Estas fueron representadas y parametrizadas empleando los softwares ChemOffice2004 y DRAGON con el objetivo de conformar una serie externa para proceder a su posterior cribado virtual y predecir su IC_{50} . Los valores de IC_{50} obtenidos con el mejor modelo se reportan en la tabla 3.

Después de analizados los valores de IC_{50} obtenidos para de las sapogeninas esteroidales se puede concluir que todas poseen un gran potencial de inhibición frente a la enzima ADAM-17, de todas ellas la yucagenina, la clorogenina y la rockogenina son las que mayores potenciales presentan.

Al analizar las estructuras de las sapogeninas se puede apreciar que todas poseen el mismo esqueleto esteroideal, las diferencias radican principalmente en la presencia y número de grupos funcionales (Figura 2). Todas presentan un grupo funcional hidroxilo (OH) en el anillo A (posición 3), sin embargo, la yucagenina, la clorogenina y la rockogenina, con valores de IC_{50} muy similares, poseen uno adicional en el anillo A (posición 2), en el anillo B (posición 6) y en anillo C (posición 12) respectivamente. Es importante señalar que la diosgenina, hecogenina y tiogenina poseen actividad antiinflamatoria probada de forma

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

experimental. La comparación de sus estructuras con las demás sapogeninas se convierte en una pieza fundamental para dilucidar de forma teórica si las demás sapogeninas podrían poseer dicha actividad. Por ejemplo, la única diferencia entre las estructuras de la diosgenina y la yucagenina radica en un grupo OH adicional en la yucagenina, y esto también puede evidenciarse en las estructuras de la clorogenina y la rockogenina en comparación con la tiogenina. En resumen, las sapogeninas que tienen un segundo grupo hidroxilo en su estructura, independientemente de la posición en que se encuentre, mostraron los mejores potenciales de inhibición frente a la enzima evaluada. Este análisis no es conclusivo teniendo en cuenta que sólo se cribaron las sapogeninas presentes en esta planta, por lo que se sugiere enriquecer el cribado virtual con un mayor número de compuestos de este tipo, para buscar una mayor diversidad estructural.

Como se había mencionado anteriormente la yucagenina es la sapogenina de mayor abundancia en la planta, mientras que la clorogenina y la rockogenina se encuentran en cantidades muy pequeñas, por lo tanto, la fracción rica en yucagenina y el crudo de sapogeninas obtenidos a partir de las hojas de la planta, fueron los seleccionados para la realización de los estudios biológicos.

Tabla 3. Valores IC₅₀ de las sapogeninas esteroidales predichos por el modelo QSAR frente a la enzima ADAM-17

Nombre	IC ₅₀ Predicho
Yucagenina	0,0019
Diosgenina	0,0406
Rockogenina	0,0018
Clorogenina	0,0018
Hecogenina	0,0418
Tiogenina	0,0040

3.2. Obtención de los extractos

A partir de los resultados obtenidos en el estudio QSAR se procede a la obtención de las sapogeninas esteroidales mayoritarias derivadas de la planta *Agave brittoniana* Trel en el

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

laboratorio de química orgánica; principalmente yucagenina para la posterior evaluación farmacológica de actividad antiinflamatoria.

3.2.1. Preparación del material vegetal

Se obtuvo una masa de 2,00 kg, con un valor promedio de 1.212% de humedad residual el cual se encuentra dentro del rango permisible según la Norma Ramal de Salud Pública # 309

3.2.2. Obtención del extracto hidroalcohólico

A partir de la masa obtenida en el proceso de molinado de las hojas de la planta se realizaron extracciones con etanol al 70 % con un tiempo de duración de 94 horas entre cada una de ellas. Se determinó de forma cuantitativa que la cantidad de cuatro extracciones eran las necesarias para obtener un mayor rendimiento pues, a medida que se realizaban las mismas, se tomó un mililitro de la fase orgánica y se determinó la masa obtenida (operación que se realizó por triplicado). Finalmente en la cuarta extracción la masa era muy poco significativa por lo que la realización de una quinta implicaría un gasto innecesario de reactivos. En tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4. Resultados de la obtención del extracto hidroalcohólico

Masa molinada seca (g)	Masa del extracto obtenida (g)	% de Extracción con respecto a la masa del extracto seca
200	82,45	41,23

3.2.3. Obtención del extracto n-butanólico

A partir de la masa obtenida en el extracto hidroalcohólico se procedió a realizar extracciones empleando como solvente n-butanol previamente saturado en agua. Se determinó de forma cuantitativa que la cantidad de cuatro extracciones es la necesaria para obtener un mayor rendimiento de forma similar a como se realizó en la obtención del extracto hidroalcohólico, con un tiempo de duración de 24 horas entre cada una de ellas. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5. Resultados de la obtención del extracto n-butanólico

Masa del extracto hidroalcohólico (g)	Masa del extracto n-butanólico (g)	% de Extracción
82,45	16,85	20,44

3.2.4. Obtención del crudo de saponinas esteroidales

A partir del extracto n-butanólico se procedió a la obtención del crudo de saponinas esteroidales. A continuación se representan los resultados obtenidos.

3.2.4.1. Hidrólisis ácida. Comprobación de la obtención del crudo de saponinas esteroidales

Después de terminada la hidrólisis se obtuvo un crudo de color carmelita oscuro. Posteriormente se procedió a identificar si la hidrólisis fue completada mediante los ensayos cualitativos descritos (Ver epígrafe 2.2.8).

Prueba de la espuma

Para comprobar que la hidrólisis fue completa el primer análisis realizado fue la prueba de la espuma, donde se observó que al finalizar el tiempo de hidrólisis no había formación de espuma en agua.

Identificación cualitativa de azúcares reductores

La identificación cualitativa del reactivo de Fehling y se realizó de forma visual. Se determinó que en los primeros cuarenta minutos la presencia de azúcares reductores era baja pues la muestra se tornó de color verde. A los sesenta minutos la disolución se tornó de color rojo ladrillo por la precipitación del óxido de cobre (I) evidenciando el aumento de la concentración de azúcares reductores. Esta coloración se mantuvo constante hasta finalizadas las tres horas de hidrólisis.

Prueba de hemólisis

El test de hemólisis constituye una prueba rápida y relativamente sencilla para detectar la presencia de saponinas en el medio (Bruneton, 2001). Su objetivo pudiera ser simplemente identificativo, como en este caso, aunque también puede ser empleado con fines cuantitativos. La tabla 6 muestra los resultados cualitativos del test, como se aprecia a la hora y cuarenta minutos se registró la posible ausencia de saponinas en el hidrolizado.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este resultado sugiere que ya en este tiempo ha ocurrido la hidrólisis total y por tanto la posible ausencia de saponinas en el medio determina que no se produzca hemólisis.

La certeza absoluta de la ausencia de saponinas y por tanto de la hidrólisis total, no puede ser aceptada. La literatura reporta que aunque las saponinas son hemolíticas existen algunas que no provocan hemólisis. Una elevada concentración de saponinas monoglicosiladas provoca un rompimiento de la membrana celular. Este efecto se ha detectado en eritrocitos y otras células de animales, hongos e incluso bacterias (De Costa et al., 2011). La característica diferenciadora principal radica en la facilidad que tienen las saponinas monoglicosiladas para formar micelas y producir la lisis celular. Sin embargo, se ha encontrado que el tipo y la concentración de los monosacáridos, además de la presencia de los grupos funcionales como hidroxilos o carboxilos sobre el anillo E esteroidal, son determinantes en el aumento o disminución de la capacidad hemolítica, dado el arreglo tridimensional que sufre, favoreciendo la interacción entre la aglicona de las saponinas y el colesterol de la membrana celular del organismo, lo cual origina la ruptura de la membrana y la liberación de la hemoglobina al medio circundante (Letelier et al., 2011). Las saponinas di y triglicosiladas causan un menor impacto en la membrana eritrocitaria, debido principalmente a un impedimento estérico (Kuljanabthagavad and Wink, 2009). Woldemichael y *col.* (Woldemichael and Wink, 2001) determinaron que la saponina bidesmosídica identificada como ácido 3-O- β -glucuronopiranosiloleanólico 28-O- β -glucopiranosil éster fue una especie activa en un test hemolítico, a una concentración de 260 $\mu\text{g/mL}$, por lo que catalogan su actividad hemolítica como débil.

El test de hemólisis en estas condiciones, resultó ser más sensible que el ensayo de Fehling. En este último caso, a la hora de muestreo se apreció el cambio cualitativo que persistió hasta el final y que significaba la hidrólisis total. Sin embargo a ese mismo tiempo se detectó hemoglobina en el medio, indicativo de hemólisis y por tanto de saponinas presentes en la muestra.

Tabla 6. Resultados cualitativos del test de hemólisis

Tiempo de muestreo (min.)	Presencia de hemólisis
20	+
40	+
60	+
80	+
100	-
120	-
140	-
160	-
180	-

3.2.4.2. Obtención de la fracción de acetato de etilo

Para la purificación del extracto se realizaron tres extracciones con acetato de etilo y agua hasta que todas las sapogeninas pasaron a la fase orgánica. Finalmente se obtuvo una masa de 4,00 g del crudo de sapogeninas esteroidales.

3.2.5. Fraccionamiento del crudo de sapogeninas esteroidales

Al realizar el fraccionamiento del crudo de sapogeninas esteroidales en la columna cromatográfica se observó una sección verde aproximadamente de 2,00 cm característico de la clorofila que posteriormente descendió en forma de un líquido del mismo color. Luego descendió un líquido del mismo color del disolvente que constituyó la mayoría de las fracciones obtenidas. Por último se separó una sección de color pardo oscuro donde no se apreció la existencia de sapogeninas esteroidales.

Inicialmente se obtuvieron 186 fracciones (Tabla 7) puesto que se duplicó la columna en la mayoría de ellas ocurrió la precipitación de un sólido amorfo de color blanco que según estudios previos realizados por Guerra de León et al., 2005, se puede identificar como sapogeninas esteroidales (Guerra de León, 2005). Todas las fracciones fueron monitoreadas tanto por el método visual como por CCD para agruparlas según su color y su similitud cromatográfica. Todas las placas realizadas mostraron la presencia de un compuesto de coloración violeta intenso al ser revelado con ácido sulfúrico, de Rf igual a 0,60 que coincide con el Rf de la yucagenina, esto tiene sentido porque este núcleo base de sapogenina es el más abundante en la planta según lo reportado en la literatura (Guerra

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de León, 2005). Además se observaron dos manchas adicionales menos intensas y solo en las primeras fracciones, una de ellas corresponde a la clorogenina con un Rf igual 0,48 y la otra a la diosgenina de Rf igual 0,81. Hay que señalar que solo se contó con el patrón de diosgenina para la identificación de las manchas y que se puede asegurar la presencia de yucagenina y clorogenina porque los Rf mostrados coinciden con Guerra *et al.*, 1999.

Tabla 7. Fracciones obtenidas para las dos columnas cromatográficas*

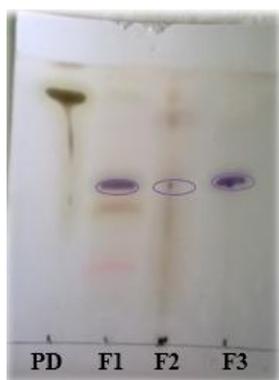
Fracciones	Apariencia física
1-5	Líquido de color transparente (parte del volumen muerto)
5-16	Líquido de color verde oscuro (clorofila)
16-30	Líquido de color verde claro (clorofila)
31-93	Líquido de color transparente con precipitación de un sólido blanco amorfo (sapogeninas esteroideas)

*solo se representa una columna porque de ambas se obtuvieron los mismos resultados

Finalmente se obtuvieron tres fracciones (Tabla 8), las tres ricas en yucagenina pero con la diferencia que la primera fracción presenta además clorogenina y la segunda diosgenina y finalmente la tercera fracción es la de mayor grado de pureza en yucagenina (Figura 6). Este resultado permitió seleccionar esta última fracción (F3), junto al crudo de sapogeninas, como las sustancias provenientes del *Agave brittoniana* Trel. para ser evaluadas en modelo *in vivo* de inflamación crónica.

Tabla 8. Fracciones de sapogeninas unidas por similitud cromatográfica

Fracciones	Composición de sapogeninas
F1 (31-50)	Yucagenina, clorogenina
F2 (51-57)	Yucagenina, diosgenina
F3 (58-93)	Yucagenina



Donde:

PD: Patrón de diosgenina.

F1: (31-50)

F2: (51-57)

F3: (58-93)

Figura 6. Cromatograma final del fraccionamiento del crudo de sapogeninas esteroidales

3.3. Evaluación farmacológica de las fracciones del crudo de sapogeninas

Estudios precedentes ya habían demostrado, que el extracto n-butanólico correspondiente al crudo de saponinas, presentaba actividad antiinflamatoria en modelo de inducción de granuloma por pellet de algodón (Martín, 2016).

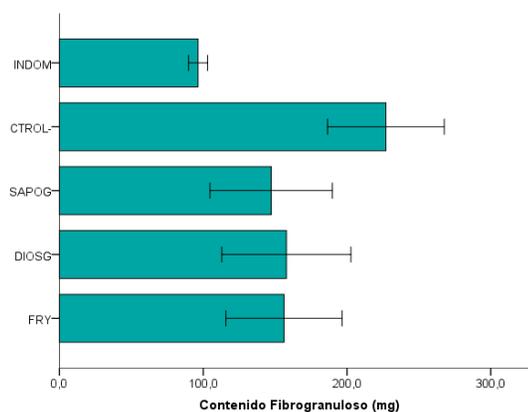
En el presente ensayo *in vivo* se determinó el efecto antiinflamatorio de las sapogeninas, obtenidas por hidrólisis de las saponinas correspondientes, lo cual nos permite evaluar la contribución de las geninas al efecto antiinflamatorio ya probado de los heterósidos mayoritarios de *Agave brittoniana* Trel.

El test de Kruskal Wallis señaló diferencias altamente significativas entre los grupos al analizar las variables peso del contenido acuoso ($p < 0,007$) y peso del contenido fibrogranuloso ($p < 0,002$). Un análisis posterior utilizando el método no paramétrico de Mann Whitney para comparar con el grupo control negativo o sin tratamiento, mostró que el control indometacina presentó valores significativamente menores tanto del contenido acuoso ($p < 0,004$) como el fibrogranuloso ($p < 0,002$). Sin embargo solo el contenido fibrogranuloso disminuyó con el tratamiento de las sapogeninas presentes en el *Agave brittoniana* (tabla 9).

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9. Comparación del contenido fibrogranuloso. Los resultados se expresan como la MEDIA± DE.

Grupos	Contenido Fibrogranuloso (mg)	p
Indometacina	96,379 ± 8,13	0,004
Control -	227,05 ± 49,76	-
Crudo de sapogeninas	147,25 ± 52,17	0,025
Diosgenina	157,83 ± 55,00	0,05
FRY	156,20 ± 45,21	0,045



La tabla 10 muestra como las sapogeninas del *Agave brittoniana* Trel. ejercen su efecto en la fase proliferativa de manera más eficaz. Aunque el porcentaje de inhibición de estas moléculas en esta fase fue inferior al mostrado por la indometacina, es comparable con el reportado por otros autores. Por ejemplo, Rodríguez Rivas et. al., 2005, evaluó en modelo de granuloma inducido por algodón, el jugo de *Morinda citrifolia* L, el cual presenta entre otros metabolitos a las saponinas. El porcentaje de inhibición fue inferior a los reportados en este estudio, al probar la mayor dosis del jugo, correspondiente a 20 mL/kg, (Rodríguez Rivas et al., 2005). La presencia de metabolitos como los flavonoides y alcaloides y la ausencia de saponinas, caracteriza la especie *Aconitum heterophyllum*, evaluada por Santosh Kumar Verma et.al., 2010 en el mismo modelo de inflamación *in vivo* empleado en este estudio (Verma et al., 2010). En este caso los valores del porcentaje de inhibición de un extracto etanólico usado a la dosis de 450 mg/kg, fue de 25,79, valor inferior al obtenido en la presente investigación para las sapogeninas y sus fracciones. Por otra parte, el etil-p-metoxicinamato, aislado de la especie *Kaempferia galanga* inhibe la formación del granuloma en un 44,21% a una dosis de 400 mg/kg. En estudios anteriores realizados a la fracción butanólica del *Agave brittoniana* Trel por Martín et. al., 2016, se demostró que este crudo de saponinas a 50 mg/kg inhibía la formación del granuloma en un 45,81%. (Martín, 2016). Este valor ligeramente superior al obtenido con fracción enriquecida en yucagenina y el crudo de sapogeninas, este último a la misma dosis de 50 mg/kg, pudiera sugerirnos que un estudio de formulación, que garantice mejor biodisponibilidad de estas

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

moléculas, insolubles en medio acuoso, pudiera ser necesario, para garantizar una efectiva dosificación en un estudio crónico como este.

Tabla 10. Valores de los porcentajes de inhibición de la fase crónica (% iInh FC) del contenido húmedo (CH) y del fibrogranuloso (CF)

Grupos	% iInh FC-CH	% iInh FC-CF
FRY	13,67	31,21
Diosgenina	12,79	30,49
Sapogeninas	17,12	35,15
Indometacina	30,35	58,41

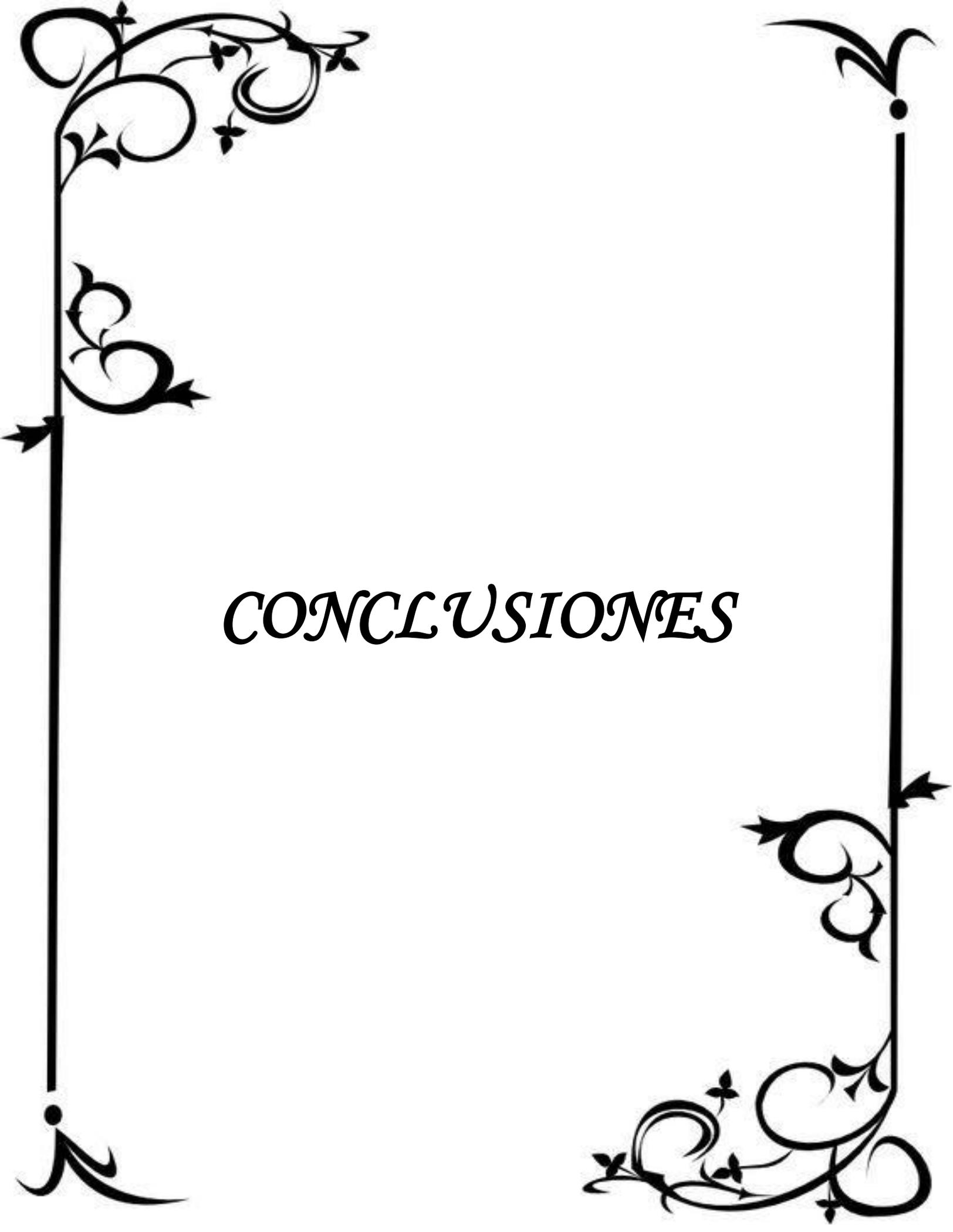
La fase crónica se caracteriza por presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, la fibrosis y la necrosis (Robbins et al., 2015). Estudios anteriores para evaluar el efecto antiinflamatorio con el crudo de saponinas de *Agave brittoniana* Trel., habían mostrado el efecto farmacológico de estas moléculas en la fase proliferativa de la formación de tejido fibrogranuloso (Martín, 2016). Al igual que en el presente estudio, en la fase exudativa, la aplicación de los productos provoca incremento del contenido acuoso, mayor que el grupo sin tratamiento y que la indometacina.

Los resultados obtenidos, sugieren que el anillo esteroidal de estos metabolitos, correspondiente a sus respectivas sapogeninas, es la parte de la molécula con mayor contribución a la actividad farmacológica. Estudios previos ya había demostrado la capacidad antiinflamatoria de la hecogenina y la tiogenina derivadas del *Agave americana* realizados por Peana et. al., 1997 en modelos de edemas inducidos por carragenina (Peana et al., 1997). También se ha comprobada la actividad antiinflamatoria de la diosgenina por Rahman et. al., 2013, en modelo de edema inducido por carragenina derivada de la planta *Tinospora malabarica* Miers.

Como habíamos señalado anteriormente la biodisponibilidad de las saponinas se incrementa a medida que van perdiendo sus restos monosacáridos y se convierten en sus sapogeninas correspondientes (Vázquez, 2017). Esto es indicativo que son las sapogeninas de la especie las que tienen mayor capacidad para llegar a sus células dianas. Teniendo en cuenta que la yucagenina es la sapogenina mayoritaria (Guerra J.O. et al., 2005), los resultados nos permiten sugerir que esta molécula es la de mayor contribución al efecto

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

antiinflamatorio observado en la especie. Por otra parte, el resultado del cribado *in silico* demuestra que existe una alta probabilidad que la vía de señalización del FNT- α a través de su activación por la ADAM-17, esté implicada en el efecto observado en las fracciones de sapogeninas del *Agave brittoniana* Trel. Moléculas con efecto inhibitorio frente a la enzima ADAM-17 han sido reportadas por varios autores, por ejemplo, los estudios *in vitro* realizados por Lee y colaboradores lo demostraron en un grupo de compuestos (Lee et al., 2002), de tamaño estructural comparable a las sapogeninas. Además, el trabajo realizado por Aumor, et. al, 1998, también lo pudo comprobar cuantificado la capacidad inhibidora de las moléculas a través de la liberación soluble del FNT- α (Amour et al., 1998).



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Atendiendo a los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Empleando una base de datos de 390 compuestos inhibidores de la enzima ADAM-17, estructuralmente diversos y con valores de IC_{50} evaluados experimentalmente, se conformó un modelo QSAR robusto y estable con un alto valor predictivo ($Q^2_{ext} = 52.22$).
2. Mediante el cribado virtual empleado el modelo QSAR obtenido se predijeron los valores de IC_{50} de las sapogeninas esteroidales concluyendo que todas poseen un gran potencial de inhibición frente a la enzima ADAM-17 y que de todas ellas la yucagenina, la clorogenina y la rockogenina fueron las que presentaron mayores potenciales de inhibición frente a esta enzima.
3. El procedimiento para el fraccionamiento del crudo de sapogeninas utilizando cromatografía de columna fase normal, logró una separación eficaz obteniéndose tres fracciones ricas en yucagenina, siendo una de ellas la de mayor grado de pureza y por lo tanto objeto de estudio biológico.
4. La sapogeninas aisladas de la especie *Agave brittoniana* Trel. demostraron efecto antiinflamatorio en modelo crónico experimental con un porcentaje de inhibición del contenido fibrogranulomatoso entre un 30 y 35 % considerado aceptable para este modelo.

A decorative border in black ink, featuring intricate scrollwork, floral motifs, and leaf-like patterns. The border is composed of four corner pieces and two vertical side pieces. The top-left and bottom-right corners are more elaborate, with multiple layers of scrolls and leaves. The top-right and bottom-left corners are simpler, with a single leaf-like flourish. The vertical side pieces are straight lines with small decorative elements at the top and bottom.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto dosis respuesta en modelo de inflamación crónica del crudo de sapogeninas y fracciones ricas en yucagenina extraídas del *Agave brittoniana* Trel.
2. Enriquecer el cribado virtual con un mayor número de sapogeninas esteroidales derivadas de otras plantas.

A decorative border in black ink, featuring intricate floral and scrollwork patterns. The border is composed of vertical lines on the left and right sides, with elaborate flourishes at the corners and midpoints. The top-left and bottom-right corners have large, swirling floral motifs, while the top-right and bottom-left corners have smaller, more delicate designs. The central text is framed by these decorative elements.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K., JAIN, D. C., GUPTA, R. K. & THAKUR, R. S. 1985. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry*, 24, 2479-2496.
- AKDEMIR, Z., KAHRAMAN, C., TATL, I., AKKOL, E., SÜNTAR, I. & H., K. 2010. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. *Ethnopharmacol.*
- ALZINA, R. B. 1989. Introducción conceptual al análisis multivariable. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL Y SPAD. PPU, SA: Barcelona.
- AMOUR, A., SLOCOMBE, P., WEBSTER, A., BUTLER, M., KNIGHT, G. & SMITH, B. 1998. TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *Federation of European Biochemical Societies*, 435, 39-44.
- ARMAS, A. J. P. 2011. Estudio fitoquímico de especies nativas de Cuba pertenecientes a la familia agavacea y evaluación de sus actividades biológicas.
- BHATTARAM, V., GRAEFE, U., KOHLERT, C., VEIT, M. & DERENDORF, H. 2002. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine*, 9, 1-33.
- BRENNAN, F. M., GREEN, P., AMJADI, P., ROBERTSHAW, H. J., ALVAREZ IGLESIAS, M. & TAKATA, M. 2008. Interleukin-10 regulates TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. *European Journal of Immunology*, 38, 1106–1117.
- BRERETON, R. G. 1990. *Chemometrics*, Ellis Horwood, Chichester, UK,.
- BRUNETON, J. 2001. Saponósidos. *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. (2^a. Ed.). Zaragoza, España. Editorial Acribia, SA, 664-709.
- CHEEKE, P., PIACENTE, S. & OLESZEK, W. 2006. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *yucca schidigera*: A review. *J Inflammation*, 3.
- DA SILVA, B. P., C., D. S. A., SILVA, G. M., MENDES, T. P. & PARENTE, J. P. 2002. A New Bioactive Steroidal Saponin from *Agave attenuata*. *Z. Naturforsch*, 57 423-428.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE COSTA, F., CA YENDO, A., D FLECK, J., GOSMANN, G. & G FETT-NETO, A. 2011. Immunoadjuvant and anti-inflammatory plant saponins: characteristics and biotechnological approaches towards sustainable production. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11, 857-880.
- EFRON, B. 1982. *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Planes*, Philadelphia, PA, Society for Industrial and Applied Mathematics.
- EGUIARTE, L. E., SOUZA, V. & SILVA MONTELLANO, A. 2000. Evolución de la familia *Agavaceae*: Filogénia, biología reproductiva y genética de población. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 66, 131-150.
- FRANK, I. E. & FRIEDMAN, J. H. 1993. A statistical view of some chemometrics regression tools. *Technometrics*, 35, 109–135.
- GAUTAM R, J. S., SAKLANI A. 2011. Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition. . *J Ethnopharmacol*, 133, 928 - 930.
- GOLDBERG, D. 1989. Genetics Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. *Addison Wesley*.
- GÓMEZ ESTRADA, H. A. G. R., K.; MEDINA J. D. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 182 - 217.
- GÓMEZ, H., GAITÁN, R., FRANCO, L., MERCADO, J., RODRÍGUEZ, E., MÉNDEZ, D. & DÍAZ, F. 2005. Flora Medicinal del Norte de Bolívar, Colombia: Un Enfoque Cuantitativo y Evaluación Preliminar de la Actividad Antiinflamatoria de Algunas Especies Promisorias. *III Encuentro Nacional de Química de Medicamentos*.
- GONZÁLES, Y., BOFFILL, M., BERMÚDEZ, D., CASTILLO, O. & SÁNCHEZ, C. 2009. Hemólisis producida por *solanum melongena*, *Cissus sicyoides*, *Plantago major* y *Achyranthes aspera*. *Medicentro* 13.
- GRAMATICA, P. 2007. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Comb Sci*, 26, 694-701.
- GUERRA DE LEÓN, J. O. 2005. *Compuestos con actividad antiparasitaria del Agave brittoniana T*. Doctoral, Universidad de Cádiz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUERRA, J. O., MENESES, A., SIMONET, A. M., MACÍAS, F. A., NOGUEIRAS, C. M. & GÓMEZ, A. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical*, 56, 1645-1652.
- JARRY, A. B.-N., K.; MASSON, D.; DEJOIE, T.; LEHUR, P. A.; MOSNIER, J. F.; DENIS, M. G.; LABOISSE, C. L. 2006. Human colonic myocytes are involved in postischemic inflammation through ADAM17 dependent TNF- α production. *British Journal of Pharmacology* 147, 64-72.
- KIER, L. B. & HALL, L. H. 1999. *Molecular Structure Description. The Electrotopological State*, Academic Press: San Diego.
- KIM, D. S. O., LEE, I. S., JUNG, K. Y. & PARK, J. D. 1998. Anticomplementary activity of Ginseng saponins and their degradation products. 47 397-399.
- KULJANABHAGAVAD, T. & WINK, M. 2009. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry reviews*, 8, 473-490.
- LEARDI, R. 1994. Application of genetic algorithms to feature selection under full validation conditions and to outlier detection. *J. Chemom.*, 8, 65-79.
- LEARDI, R. 2001. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review. *J. Chemom.*, 15, 559-569.
- LEE, M., VERMA, V., MASKOS, K., BECHERER, D., KNAUPER, V., DODDS, P., AMOUR, A. & MURPHY, M. 2002. The C-terminal domains of TACE weaken the inhibitory action of N-TIMP-3. *Elsevier Science B.V*, 520, 102-106.
- LETELIER, M. E., RODRÍGUEZ-ROJAS, C., SÁNCHEZ-JOFRÉ, S. & ARACENA-PARKS, P. 2011. Surfactant and antioxidant properties of an extract from *Chenopodium quinoa* Willd seed coats. *Journal of Cereal Science*, 53, 239-243.
- MAHAT, M. & PATIL, B. 2007. Evaluation of antiinflammatory activity of methanol extract of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69.
- MARTÍN, D. 2016. *Evaluación en modelos experimentales del efecto antiinflamatorio de extractos de Agave brittoniana Trel subespecie Brachypus*. UCLV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

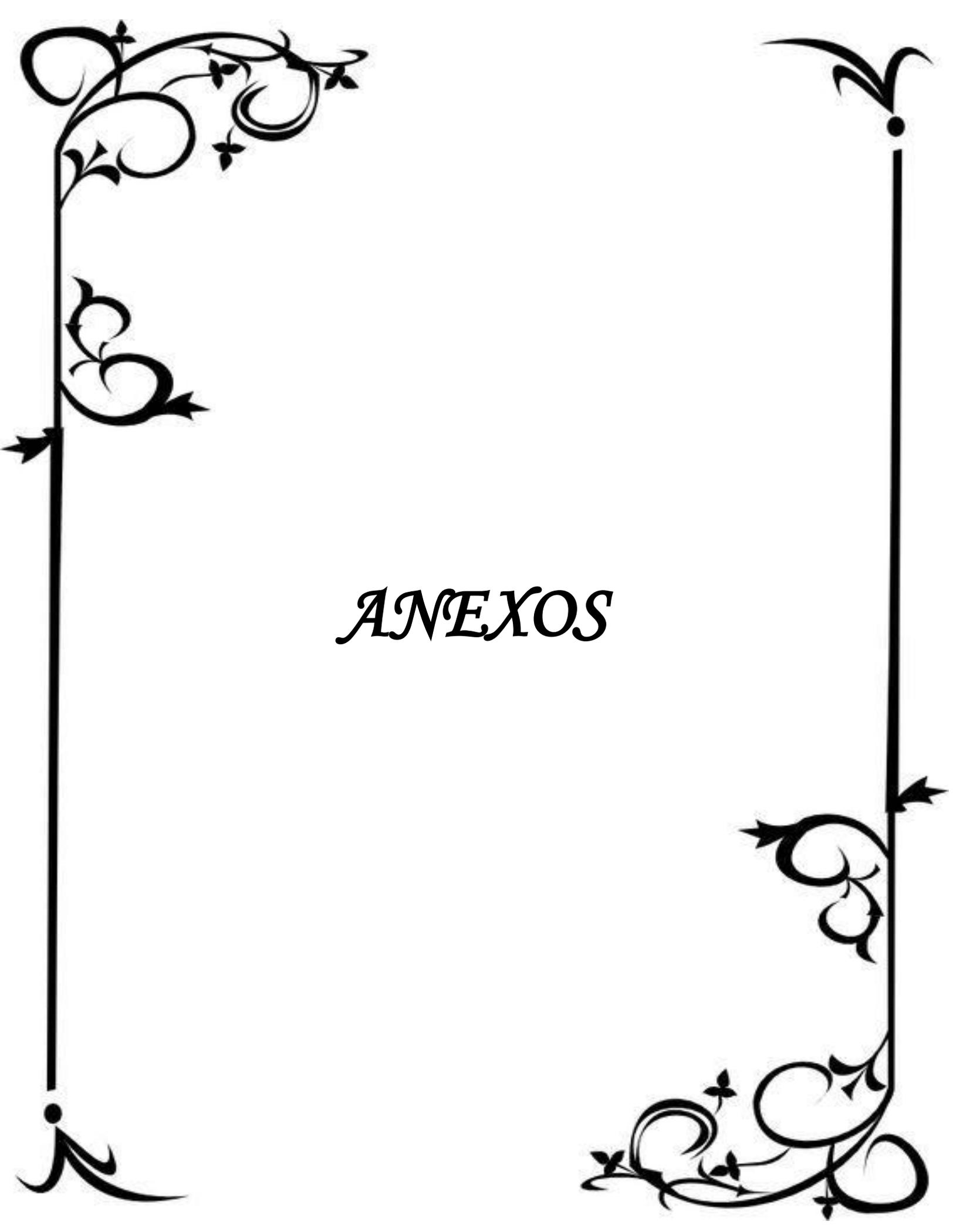
- MARTÍNEZ-SANTIAGO, O., MILLÁN-CABRERA, R., MARRERO-PONCE, Y., BARIGYE, S. J., MARTÍNEZ-LÓPEZ, Y., TORRENS, F. & PÉREZ-GIMÉNEZ, F. 2014. Discrete Derivatives for Atom-Pairs as a Novel Graph-Theoretical Invariant for Generating New Molecular Descriptors: Orthogonality, Interpretation and QSARs/QSPRs on Benchmark Databases. *J. Molecular Informatics*, 33.
- MENDOZA, A. G., E. LINARES, P., DÁVILA, F. C., R. BYE & ELIAS., T. 1995. Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. *Conservación de plantas en peligro de extinción*.
- OLAJIDE, O. A., OKPAKO, D. T. & MAKINDE, J. M. 2003. Anti-inflammatory properties of *Bridelia ferruginea* stem bark Inhibition of lipopolysaccharide-induced septic shock and vascular permeability. *J Ethnopharmacol*, 88, 221 - 224.
- PEANA, A. T., MORETTI, M. D., MANCONI, V., DESOLE, G. & PIPPIA, P. 1997. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta medica*, 63, 199-202.
- ROBBINS, S., COTRAN, R. S. & KUMAR, V. 2015. *Patología estructural y funcional*, Chicago, Illinois.
- RÜCKER, C., RÜCKER, G. & MERINGER, M. 2007. y-randomization and its variants in QSPR/QSAR. *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 2345–2357.
- SANMUGAPRIYA, E., SHANMUGASUNDARAM, P. & VENKATARAMAN, S. 2005. Anti-inflammatory activity of *Justicia prostrata* gamble in acute and sub-acute models of inflammation. *Inflammopharmacology*, 13, 493-500.
- SHAO, J. 1993. *J. Amer. Stat. Assoc.*, 88, 486.
- SINGH BAHIA, M. & SILAKARI, O. 2009. Generation of Selective TACE Inhibitors: Ligand and Structure Based Molecular Modeling, Virtual Screening, Counter Pharmacophore Screening to Get Selective Molecules. *QSAR and Combinatorial Science*, 28, 1317 – 1333
- TODESCHINI, R., BALLABIO, D., CONSONNI, V., MAURI, A. & PAVAN, M. 2004. MobyDigs. Version 1.0, TALETE srl ed.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TODESCHINI, R. & CONSONNI, V. 2008. *Handbook of molecular descriptors*, John Wiley & Sons.
- TODESCHINI, R. & CONSONNI, V. 2009. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*, wiley-VCH.
- TRIANA, D. 2014. *Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de Agave brittoniana T. en un modelo de colitis ulcerativa* Trabajo de Diploma, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- VAN DE WATERBEEMD, H. 1995a. *Chemometric Methods in Molecular Design* New York.
- VAN DE WATERBEEMD, H. 1995b. *Chemometric Methods in Molecular Design (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)*. John Wiley & Sons: New York.
- VAPNIK, V. 1995. *The Nature of Statistical Learning Theory*. Springer: New York, USA.
- VÁZQUEZ, A. 2017. Obtención de compuestos derivados del extracto n-butanólico de la planta Agave brittoniana Trel. con elevada capacidad de absorción en el intestino delgado.
- VAZQUEZ G, F. E., SANTOS J, FREIRE MS, GONZALEZ-ALVAREZ J, ANTORRENA G. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops Prod*, 28, 279 -285.
- VERMA, S., OJHA, S. & RAISH, M. 2010. Anti-inflammatory activity of *Aconitum heterophyllum* on cotton pellet-induced granuloma in rats. *Journal of medicinal plants research*, 15, 1566-1569.
- WASIK SP, T. Y., MILLER MM, MARTIRE DE 1981. Octanol - Water Partition Coefficients and Aqueous Solubilities of Organic Compounds. *NBS Techn Rep*, 81, S1-56.
- WEHRENS, R., PUTTER, H. & BUYDENS, L. 2000. The bootstrap: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 54, 35-52.
- WINYARD, P. G. Y. W., D. A. 2003. *Inflammation Protocols*.
- WOLD, S. 1978. *Technometrics*. 20, 397.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WOLD, S. & ERIKSON, L. 1995. In Chemometric Methods in Molecular Design. *van de Waterbeemd, H., Ed.; VCH Publishers: Weinheim, Germany.*
- WOLDEMICHAEL, G. M. & WINK, M. 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 2327-2332.
- ZAYAS, A. A. 1996. Los agaves de Cuba central. 44.



ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1: *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez, que crece en el jardín botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas



Anexo 2: Certificado de autorizo de alimento animal usado en el experimento, expedido por el centro suministrador (CENPALAB) y recepcionado en la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la UTEX.

FP.CA.01.14		Dirección de Alimentación y Nutrición		CENPALAB	
0376		Grupo de Producción de Alimentos Concentrados		CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCION DE ANIMALES DE LABORATORIO	
CERTIFICADO DE AUTORIZO DE ALIMENTO CONCENTRADO				Grupo Aseguramiento	
Formula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación	
GMQ 1000	II	1012018	21/02/2018	Pellet Ø 16 mm	
Especificaciones para su uso					
Dieta completa para el mantenimiento de ratas y ratones. Todo propósito. No esterilizable. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 60 días a partir de la fecha de fabricación.					
Componentes					
Maíz, Trigo, Soya, azúcar, Fosfato mono cálcico, Carbonato de calcio, Sal común, Pre mezcla de Vitaminas y Minerales, Biotronic, Micofix.					
Análisis calculado					
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%	16.00	Calcio	%	
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g	2.80	Fósforo	%	0.39
Fibra bruta (Máx.)	%	3.40	Relación Calcio/ Fósforo	%	0.79
Grasa bruta (Mín.)	%	1.50			
* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.			Realizado por:	Cargo Dirección de Producción	Firma
			Revisado por:	Cargo Distribuidor	Firma

Anexo 3. Certificado de calidad de los animales de experimentación, expedido por el centro suministrador (CENPALAB) y recepcionado en la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la UTEX.

DIRECCIÓN DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
Grupo de Aseguramiento de la Calidad
 Folio: 039

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF, Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Rata	—	—	Biochable	Cenp:SD	20007718	8
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición
90	—	90	150-200	605u	Villa Clara.	18/5/18 2:20 p.m.

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmula **ALYCO® EMO 1002** esterilizable a razón de 22.4 a 30 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Salmonella</i> sp.	Cult/ Serot		X		08/02/18	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cult/ Serot		X		08/02/18
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Cultivo		X		-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Cult/ELISA		X		08/02/18
<i>Streptococcus β hemolítico</i>	Cult/ Serot		X		08/02/18	<i>Clostridium piliformis</i>	Insp. Clínica		X		08/02/18
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Cult/ ELISA		X		08/02/18	<i>Leptospira</i> sp.	ELISA/ Miog		X		29/06/17
<i>Helicobacter</i> sp.	Cultivo		X		-	<i>Mycoplasma arthritis</i>	Cult/ELISA		X		-
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Cult/ ELISA		X		06/02/18	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Cult/ELISA		X		-
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		08/02/18						

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Endoparásitos	DIR/ FLOT		X		01/02/18
<i>Toxoplasma gondii</i>	ELISA		X		19/07/17
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	Sedimentación		X		-
Ectoparásitos	Insp. Clínica		X		-

Resultados de Patología *

Fecha: 01/02/18
 Examen macroscópico:
 No se observan lesiones microscópicas compatibles con alteraciones patológicas

Resultados de Virología * (Serología)

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDA/RCV)	IFA		X		06/09/17	Coronemeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		24/02/17
Virus Pneumonia (PVM)	IFA		X		06/09/17	Virus Sendai	ELISA/IFA		X		06/09/17
Virus Encefalomielitidis Theiler (TMEV)	IFA		X		06/09/17	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		06/09/17
Virus Toxofan (H-1)	IFA		X		06/09/17	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		06/09/17
						Virus Hantaan	IFA		X		-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de ABRIL /2018 hasta JUNIO /2018

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

Cargo	Realizado por Especialista en Liberación de Animales de Laboratorio Dirección de Calidad Grupo de Aseguramiento de la Calidad	Aprobado por Director de Producción	Revisado por Distribuidor
Firma	[Firma]	[Firma]	[Firma]