

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento: Biología

TRABAJO DE DIPLOMA

Actividad antiinflamatoria *in silico* e *in vivo* de yucagenina presente en *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez

Autora: Dayana Resino Ruiz

Tutores: MSc. Yisel González Madariaga

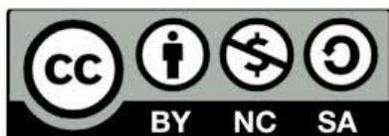
Dr. C. Juan Alberto Castillo Garit

Santa Clara , Mayo 2018
Copyright©UCLV

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

**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE
LAS VILLAS**

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DE DIPLOMA

Actividad antiinflamatoria *in silico* e *in vivo* de yucagenina presente en *Agave brittoniana* subps. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez

Autora:

Dayana Resino Ruiz

Tutores:

MSc. Yisel González Madariaga

Dr. C. Juan Alberto Castillo Garit

yiselmadariaga@infomed.sld.cu

juancgarit@infomed.sld.cu

Santa Clara, Cuba

2018

Exergo

Ya he visto pasar a Dios por delante de mi

Telescopio

Isaac Newton

Dedicatoria

*A Dios por ser mi guía, mi sustento, mi amigo, quien
le da sentido a mi vida.*

Agradecimientos

A Dios por la oportunidad que me permitió de llegar hasta aquí, sin Él hubiera sido imposible. Por haberme dado las fuerzas y capacidades de enfrentar los obstáculos.

A mis tutores Yisel y Juan Alberto por su paciencia, dedicación, entrega, y por todo lo que me enseñaron.

A mi familia, en especial a mis padres, por su preocupación y apoyo en todo lo que necesitaba.

A mi abu y mi tío por ayudarme con las cosas que necesité durante el trabajo en el laboratorio

A mi hermano Isaac por dejarme usar su laptop para trabajar, ya que la mía está en comas.

A mis amigos Yeniley, Ruth, Yoani, Susana, Neiliuwys, Yeidi, Toni que han estado pendiente de todo en cuanto acontecía, por sus oraciones, por animarme.

A todos los que me ayudaron con información Ernesto y Juan Maraton.

A la profe Arianna por su entrega en todo lo que hace, por su apoyo en momentos difíciles.

A mi compañera de laboratorio Arlena, por todo lo que aprendí junto a ella, por su paciencia conmigo.

Y a todos aquellos que no mencioné pero que también formaron parte de que este sueño se cumpliera GRACIAS,

MUCHAS GRACIAS!!!!!!!

RESUMEN

La especie *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez presenta actividad antiinflamatoria en biomodelos experimentales, además se ha comprobado la presencia de yucagenina como sapogenina mayoritaria. Sin embargo no existen estudios que comprueben si este metabolito es el principal responsable del efecto antiinflamatorio observado en la especie. Se realizaron estudios experimentales *in silico* e *in vivo* para comprobar el efecto antiinflamatorio de la yucagenina presente en esta especie. La predicción de las propiedades antiinflamatorias fue realizada utilizando los programas TOMOCOMD, STATISTICA y WEKA, para obtener un modelo computacional que permitió identificar los compuestos con potencial acción antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria *in vivo* fue evaluada empleando modelo agudo de inducción de edema por carragenina. Se formaron cinco grupos experimentales: fracción rica en yucagenina (20mg/kg), fracción de sapogeninas (50mg/kg), diosgenina patrón (20mg/kg) indometacina y control negativo. Los resultados del estudio *in silico* demostraron la obtención de un modelo eficaz para la detección de moléculas con potencial acción antiinflamatoria. Entre las sapogeninas identificadas por el modelo como potenciales antiinflamatorias se encontró la yucagenina. El modelo agudo *in vivo* corroboró que todas las fracciones de sapogeninas evaluadas mostraron propiedades antiinflamatorias elevadas, incluso mayores que la indometacina. La fracción rica en yucagenina desde la primera hora inhibió la formación del edema. Concluimos que las sapogeninas presentes en *Agave brittoniana* Trel, especialmente la yucagenina como sapogenina mayoritaria, presenta potente actividad antiinflamatoria.

Palabras claves: *Agave brittoniana*, carragenina, *in silico*, yucagenina

ABSTRACT

Agave brittoniana subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez presents anti-inflammatory activity in experimental biomodels. It has also been proven the presence of yucagenin as majority sapogenin. However, studies don't exist that check if this metabolite is the main responsible for the anti-inflammatory effect observed in this specie. Two experimental studies, *in silico* and *in vivo* were carried out to evaluate the anti-inflammatory effect of yucagenin, present in the *Agave brittoniana* subsp. *brachypus*. The prediction of anti-inflammatory properties was performed using the programs TOMOCOMD, STATISTICA and WEKA, to develop a computational model useful to identify compounds with potential anti-inflammatory action. The anti-inflammatory activity *in vivo* was evaluated using an acute model the carrageenan-induced rat paw edema test. Thirty animals were used divided into five experimental groups: fraction rich in yucagenin (20mg / kg), fraction of sapogenins (50mg / kg), diosgenin standard (20mg / kg) indomethacin and negative control. From the *in silico* study we obtaining a good model to predict of anti-inflammatory activity of molecules. Among the sapogeninas identified with this model, yucagenin was found as potential anti-inflammatory. The acute *in vivo* model showed that all the sapogenin fractions evaluated exhibited high anti-inflammatory properties, even higher than indomethacin. The fraction rich in yucagenin inhibited the formation of edema from the first hour. We conclude that the sapogenins present in *Agave brittoniana* Trel, especially the yucagenin as a major sapogenin, have potent anti-inflammatory activity.

Key words: *Agave brittoniana*, carragenin, *in silico*, yucagenin.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Revisión Bibliográfica | 3 |
| 2.1 Inflamación. Generalidades | 3 |
| 2.1.1 Fisiopatología | 3 |
| 2.1.2 Inflamación aguda | 4 |
| 2.1.3 Modelos experimentales de inflamación | 7 |
| 2.1.4 Fitoterapia antiinflamatoria | 7 |
| 2.2 Género <i>Agave</i> | 8 |
| 2.2.1 Generalidades | 8 |
| 2.2.2 <i>Agave brittoniana</i> Trel | 9 |
| 2.2.3 Antecedentes de estudios antiinflamatorios del género <i>Agave</i> | 10 |
| 2.2.4 Fitoquímica | 10 |
| 2.2.4.1 Identificación y aislamiento de saponinas y sapogeninas | 11 |
| 2.2.4.2 Yucagenina | 12 |
| 2.4 Estudios QSAR en el diseño molecular | 13 |
| 2.4.1 Metodología general empleada en los estudios QSAR | 13 |
| 2.4.2 Descriptores de la estructura química | 13 |
| 2.4.3 Los Métodos Quimiométricos en los estudios QSAR | 14 |
| 2.4.3.1 Métodos de clasificación | 14 |
| 2.4.4 Investigaciones realizadas para predecir la actividad antiinflamatoria | 16 |
| 3. Materiales y Métodos | 17 |
| 3.1 Predicción de la actividad antiinflamatoria de sapogeninas esteroideas utilizando modelos QSAR | 17 |
| 3.1.1 Base de Datos empleada en el estudio QSAR | 17 |
| 3.1.2 Programas empleados | 17 |
| 3.1.3 Análisis quimiométrico | 19 |
| 3.1.4 Árbol de Clasificación J48 | 19 |
| 3.2 Actividad antiinflamatoria de fracción rica en yucagenina en modelo agudo <i>in vivo</i> | 19 |
| 3.2.1 Obtención de fracciones ricas en yucagenina | 19 |
| 3.2.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> | 21 |
| 4. Resultados y Discusión | 4 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Predicción de la actividad antiinflamatoria de sapogeninas esteroidales utilizando modelos QSAR..... | 4 |
| 4.2 Actividad antiinflamatoria de fracción rica en yucagenina en modelo agudo <i>in vivo</i>..... | 5 |
| 4.2.1 Obtención de fracciones ricas en yucagenina | 6 |
| 4.2.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>..... | 7 |
| Conclusiones | 34 |
| Recomendaciones | 35 |
| Referencias Bibliográficas | 40 |

Introducción

1. Introducción

La inflamación es considerada el primer mecanismo fisiológico de defensa del organismo ante infecciones, alergias y daños por agentes físicos y químicos. Esta respuesta puede ser persistente e inducir o agravar otras enfermedades, conduciendo a procesos inflamatorios agudos o crónicos, y la consecuente necesidad de utilización de terapias medicamentosas Flórez *et al.* (2008). Dentro de los medicamentos usados para el control de los procesos inflamatorios, los esteroides o glucocorticoides y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen los más utilizados a nivel mundial (Lanas, 2001).

Debido al amplio uso de estos fármacos y la alta incidencia de reacciones adversas que presentan, es de interés, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiinflamatoria para el desarrollo de nuevos fármacos eficaces y seguros desde el punto de vista terapéutico (Siverio *et al.*, 2012). Los productos naturales específicamente aquellos que provienen de plantas medicinales constituyen una fuente inagotable de metabolitos activos para el tratamiento de diversas patologías incluyendo las relacionadas con procesos inflamatorios. Un ejemplo de especie que pudiera ser usada con este fin es *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez, endémica de la región central de Cuba y pertenece a la familia *Asparagaceae*.

Las saponinas presentes en el género *Agave* se han evaluado en diferentes modelos biológicos. Las saponinas del *Agave lecheguilla* Torr. y *Agave lophantha* Schiede presentan efecto antimicrobiano sobre *Helicobacter pylori* (González, 2014). Trabajos recientes desarrollados en la Unidad de Toxicología Experimental de Villa Clara han demostrado, en animales de experimentación, que el crudo de saponinas extraídas del *Agave brittoniana* tiene actividad antiobesidad (Rivero, 2016), antiulcerosa (Fernández, 2014), hipolipemiente (Vizcaino, 2017) y antiinflamatoria (Martín, 2016). Esta última propiedad farmacológica ha sido una de las más estudiadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a la presencia del componente inflamatorio en un gran número de patologías.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso en el que se invierten millones de dólares (Louis, 2003). Inicialmente es necesario probar miles de productos químicos en animales de laboratorio. El uso del método prueba y error no solo implica grandes inversiones de dinero y tiempo, también, dilemas de tipo ético, debido a que la investigación implica el uso de animales y su posterior sacrificio (Castillo, 2008). En este sentido los estudios *in silico* ofrecen una alternativa a la experimentación animal, evitando el sacrificio de animales de laboratorio y se han convertido en herramienta eficaz para predecir un número infinito de propiedades biológicas. Un ejemplo de este tipo de estudio es el diseño computarizado de fármacos. Este método implica crear bibliotecas digitales con diferentes bases de datos que contienen estructuras químicas, con aplicaciones farmacológicas, agroquímicas, industriales o de algún otro tipo de uso (Medina *et al.*, 2006). La actividad antiinflamatoria de muchas moléculas químicas han sido

correctamente predichas con el empleo de estos métodos, por ejemplo: Lithospermidin A, Andrographolide, Capillartemisin B, Loganin, PrecatorinI, Xanthumanol, Magnolignan D, 3-Hexenyl glucoside, Gancaonin R, Cnidioside C, Regaloside A, Platydesmine, Cleomiscosin A, Cleomiscosin B, Cleomiscosin C (Ehrman *et al.*, 2010, Kumar *et al.*, 2011).

Estudios experimentales en modelo animal han demostrado la actividad antiinflamatoria de diferentes saponinas. Dentro de estas, se encuentra la diosgenina, presente en *A. brittoniana*, y en otras especies de la familia *Asparagaceae* (Reyna *et al.*, 2008). Las investigaciones *in silico* para predecir este efecto en este tipo de moléculas son muy escasas. Un estudio reciente publicado por Kim *et al.* (2016) se comprobó que las saponinas triterpénicas aisladas de *Panax vietnamensis* Ha & Grushv inhibían el factor de necrosis tumoral α (TNF- α); mediador que es liberado durante los procesos inflamatorios.

La yucagenina, saponina esterooidal mayoritaria en *Agave brittoniana* Trel. subsp. *brachypus* (Guerra, 2005) y estructuralmente similar a la diosgenina, no ha sido evaluada como antiinflamatoria. Estudios tanto *in silico* como *in vivo* que demuestren el posible efecto antiinflamatorio de esta molécula serían de interés para el desarrollo de futuros medicamentos antiinflamatorios, a partir de esta fuente natural.

Hipótesis de investigación

La fracción rica en yucagenina extraída de *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* pudiera presentar efecto antiinflamatorio en modelos *in silico* e *in vivo*.

Objetivo General

Evaluar la actividad antiinflamatoria en modelos *in silico* e *in vivo* de fracción rica en yucagenina presente en *Agave brittoniana* subsp. *brachypus*.

Objetivos Específicos

1. Predecir la actividad antiinflamatoria de saponinas esteroidales utilizando modelos QSAR.
2. Determinar la actividad antiinflamatoria de fracción rica en yucagenina en modelo agudo de inducción de edema plantar por carragenina en ratas *Sprague Dawley*.

Revisión

Bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Inflamación. Generalidades

Etimológicamente, inflamación significa flama (del griego phlox), de donde proviene el término flogístico, denotación antigua de la inflamación. La definición actual establece que 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. Durante esta respuesta intervienen tanto componentes de la inmunidad innata, por ejemplo: barreras epiteliales, macrófagos, leucocitos, natural killer, proteínas del complemento y células dendríticas; como componentes de la inmunidad adquirida: los linfocitos B y T (Parslow *et al.*, 2001, Lichtman y Abbas, 2008). Esta respuesta protectora tiene como fin, aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente preparar al tejido dañado para su reparación (Gabay *et al.*, 1999).

Aulo Cornelio Celso, enciclopedista médico romano, describió cuatro signos cardinales que se presentan en todo proceso inflamatorio: enrojecimiento, tumor en el sentido de bulbo (edema), calor y dolor. A estos signos Rudolf Virchow y Galeno, les sumó un quinto signo clínico, *functio laesa*, que es la pérdida de funcionalidad, resultante de la limitación a la que conduce la conjugación de los cuatro signos ya mencionados (Villalba, 2014).

2.1.1 Fisiopatología

Existen diferentes mediadores que se desencadenan durante la inflamación, todo depende del factor que la provoque. Los mediadores pueden ser: biopreparados derivados de tejidos lesionados y reacción del huésped, originados en el plasma y derivados de las células. Los bioproductos derivados de tejidos lesionados y reacciones del huésped, son un término usado para designar un grupo de más de veinticinco proteínas presentes en membranas celulares y el plasma, que juegan un rol importante en los procesos de defensa del huésped y tienen tres vías de activación: La clásica, la alternativa y la vía de las lectinas. Este sistema de proteínas plasmáticas tiene cuatro funciones principales una vez activado. Una de ellas es la de participar en la liberación de péptidos biológicamente activos que median aspectos importantes de la inflamación, por ejemplo. C3a, C4a, C5a, tienen actividad anafiláctica, causando contracción del músculo liso, degranulación de mastocitos y basófilos con la consecuente liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas que inducen filtración o permeabilidad capilar. Los derivados del plasma están presentes en el mismo en formas precursoras que deben ser activadas a través de una serie de fragmentaciones proteolíticas para adquirir sus propiedades biológicas. Los mediadores derivados de las células del huésped permanecen normalmente secuestrados en gránulos intracelulares ejemplo: prostaglandinas en respuesta a un estímulo. Las células principales que secretan o sintetizan mediadores son las plaquetas, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células cebadas. Otros son

macromoléculas únicas. Los mediadores pueden actuar sobre uno o unos pocos tipos de células diana, o sobre múltiples tipos de células. A su vez el efecto puede ser diferente según el tipo de célula y tejido sobre el que actúan. Una vez activados o liberados de la célula, la mayoría de los mediadores duran muy poco tiempo. Rápidamente se degradan o son inactivados por acción de enzimas, o bien son barridos (Robbins *et al.*, 2015).

Los mediadores químicos o secretados por células del huésped, como es el caso de la histamina; amina derivada del aminoácido histidina, es liberada por basófilos y células cebadas en respuesta a diferentes estímulos. Esta liberación produce dilatación de vasos sanguíneos lo cual trae consigo disminución de la presión sanguínea y aumento de la permeabilidad de las paredes vasculares, de manera que salen a los tejidos, anticuerpos y monocitos componentes del complemento (Robbins *et al.*, 2015, Gómez, 2017).

Serotonina, se forma a partir del aminoácido triptófano. Es un mediador vasoactivo preformado presente en las plaquetas y en determinadas células neuroendocrinas. Su principal función es como neurotransmisor en el tubo digestivo. Es también vasoconstrictora, inhibe la producción de ácido clorhídrico en el tracto digestivo y estimula la contracción de la pared intestinal. Después de su actividad pasa de nuevo del espacio sináptico a la neurona que la liberó, para ser reciclada y reutilizada en otra acción o bien es procesada y convertida en una molécula inactiva (Robbins *et al.*, 2015, Mauler *et al.*, 2016).

La activación de la fosfolipasa A₂, presente en las membranas celulares, inicia dos grandes vías metabólicas a partir del ácido araquidónico. Por la vía de las ciclooxigenasas se generan las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. Por la vía de las lipoxigenasas, generan los leucotrienos (Pérez *et al.*, 2002). Las prostaglandinas producen vasodilatación local, permeabilidad vascular, inhiben la agregación plaquetaria y actúan como quimiotácticos para neutrófilos. Mientras que los leucotrienos inducen contracción del músculo liso, broncoconstricción, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y favorecen la agregación plaquetaria (Robbins *et al.*, 2015). La prostaciclina causa vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular (Neal, 2009) y los tromboxanos promueve la agregación plaquetaria (Gasquez, 2003).

Las citoquinas son mediadores solubles de acción corta producidos por muchos tipos celulares (principalmente linfocitos, macrófagos activados, células endoteliales, células epiteliales, y células del tejido conjuntivo) en respuesta a una gran variedad de estímulos. Estas citoquinas son capaces de modular el metabolismo, síntesis, y secreción de otras proteínas, proliferación, diferenciación celular, así como regulación de la respuesta inflamatoria y reparadora del huésped. Dentro de estos mediadores se encuentra la IL-1 (interleuquina-1), el F.N.T. (factor de necrosis tumoral) y el interferón γ . Estas promueven el crecimiento y diferenciación de células B, activan neutrófilos, y macrófagos, estimulan la hematopoyesis, promueven la inflamación e inducen la respuesta de fase aguda. Además, este tipo de mediador incrementa la

adhesividad de leucocitos al endotelio vascular y células del músculo liso, inducen la producción de prostaglandinas, la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Parslow *et al.*, 2001, Szekanecz *et al.*, 2006).

Factores de coagulación: El sistema de la coagulación está constituido por una serie de proteínas plasmáticas que también pueden ser activadas por el factor de Hageman. El paso final de la cascada es la conversión del fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina. Mediante esta conversión se forman fibrinopéptidos que inducen un aumento de la permeabilidad vascular y de la actividad quimiotáctica para los leucocitos. La trombina también presenta propiedades inflamatorias como son el aumento en la adhesividad de los leucocitos y la proliferación de los fibroblastos (Carrillo y González, 2002).

El producto final del sistema de generación de las quininas es la bradicinina, péptido de nueve aminoácidos con potente habilidad para regular el flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar a los líquidos en tejidos inflamados, causa contracción del músculo liso extravascular, es potente dilatador arteriolar, aumenta el tamaño de los poros capilares y por lo tanto, la permeabilidad capilar, contribuyendo a la formación del edema (Parslow *et al.*, 2001, Marinovic, 2008).

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

a. Aguda: 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 con una duración corta.

b. Crónicas: Es un proceso prolongado, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación (Villalba, 2014).

2.1.2 Inflamación aguda

Es la respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo que implica modificaciones en el calibre de los vasos sanguíneos y aumento en el flujo de la sangre. Además, provoca alteraciones en la estructura de la microvasculatura que permite la salida a la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos, y migración de los leucocitos hacia el foco de la lesión en el que se acumulan *op. cit.*

Cambios vasculares: Los cambios vasculares son los primeros que ocurren de forma muy rápida tras la lesión y están dados por un período transitorio de vasoconstricción arteriolar seguido de un tiempo de vasodilatación, el cual depende del propio estímulo, con apertura de nuevos lechos capilares, aumento del flujo sanguíneo. Luego tiene lugar un retraso en la circulación por aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, que se acompaña de la salida de líquido rico en proteínas hacia los tejidos.

Acontecimientos celulares: Le continúan a los cambios vasculares y están dados por la extravasación, quimiotáxis, activación, cebado y fagocitosis de los leucocitos. Cuando el flujo de sangre es normal en las vénulas los eritrocitos permanecen en la circulación axial y desplazan a los leucocitos hacia la pared del vaso. A medida que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo, debido al aumento de la permeabilidad vascular, un número cada vez mayor de leucocitos se sitúan en la periferia a lo largo de la superficie endotelial, proceso que recibe el nombre de marginación de los leucocitos, el cual ocurre en tres fases:

Primera fase: Rodamiento

Es mediada por las selectinas, comienza cuando los neutrófilos u otros leucocitos chocan con la pared celular facilitando que las moléculas de P y E selectinas, que se expresan sobre el endotelio activado, se unan a la proteína mucina que se encuentra en la superficie de los leucocitos que presentan cadenas laterales de carbohidratos. Las selectinas y su ligando mucina son moléculas alargadas frecuentemente localizadas en la punta de las microvellosidades, lo cual incrementa su accesibilidad para la unión. Una vez adheridos los neutrófilos y otros leucocitos a la pared vascular, se ponen en contacto con una gran variedad de mediadores, por ejemplo la histamina y la trombina permiten la expresión de P-selectina mientras que I-IL y TNF que permiten la expresión de L-selectina (Robbins *et al.*, 2015).

Segunda fase: Marginación o fase de activación

Los factores quimiotácticos leucocitarios se unen a receptores situados en la superficie de los leucocitos. Esta fase es mediada por quimosinas, (citoquinas proteicas) atraen selectivamente a un tipo particular de leucocito que expresa sobre su membrana el correspondiente receptor al sitio de lesión, una vez formado un gradiente inmóvil de estas proteínas solubles *loc. cit.*

Tercera fase: Firme adhesión mediada por Integrinas

Las interacciones mediadas por las integrinas se desarrollan en forma relativamente lenta, pero conducen a una estabilidad del proceso con contactos moleculares ampliamente duraderos. Se produce el rodamiento a lo largo de la pared vascular de los neutrófilos y en pocos minutos se aplanan al endotelio (pavimentación de los leucocitos al endotelio vascular).

Una vez adheridos los neutrófilos dirigen sus pseudópodos hacia las uniones que existen entre las células endoteliales, se introducen en las mismas y quedan situados entre las células endoteliales y la membrana basal, atraviesan la misma y salen al espacio extravascular, proceso que recibe el nombre de emigración de los leucocitos (Wang *et al.*, 1995).

Después de salir de la circulación, los leucocitos se desplazan por los tejidos hacia el sitio de la lesión por un proceso llamado quimiotáxis o locomoción orientada según un gradiente químico. Ocurre por la acción combinada de moléculas de adhesión,

quimosinas y receptores, entre otros factores, donde los leucocitos obtienen la información que les indica la dirección de migración a la zona de lesión.

Una vez que los leucocitos (particularmente los neutrófilos y monocitos) han sido reclutados para actuar en el sitio de la infección o muerte celular, han de ser activados para cumplir sus funciones. Las funciones de los leucocitos consisten en: 1) reconocer los agentes causales por medio de los TLR (receptores tipo Toll) y otros receptores que emiten señales que 2) activan los leucocitos para que efectúen la fagocitosis y destruyan los agentes causales *loc. cit.*

Activación: Una vez que los leucocitos mediante el fenómeno de quimiotáxis logran alcanzar la zona de la lesión, se produce fijación de los agentes quimiotácticos a receptores específicos situados en la membrana celular del leucocito, dando lugar a la activación de la fosfolipasa C, lo cual inicia la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), en inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diaclicerol (DAG), así como liberación de Ca⁺⁺. El leucocito se mueve extendiendo unos pseudópodos que tira del resto de la célula en dirección de la extensión. Se produce la activación de los leucocitos que tiene lugar cuando se produce la unión del receptor al ligando con activación ulterior de la fosfolipasa C (Esteller, 2005).

A medida que la inflamación se desarrolla, el proceso estimula la emisión de una serie de señales de detención que ponen fin de forma activa a la reacción. Estos mecanismos de terminación activa comprenden el cambio del tipo de metabolitos del ácido araquidónico producido (los leucotrienos proinflamatorios son remplazados por lipoxinas antiinflamatorias) y la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la IL-10. Además, de impulsos nerviosos (colinérgicos, de descarga), que inhiben la producción de TNF en los macrófagos (Robbins *et al.*, 2015).

Numerosas variables pueden modificar el proceso básico de la inflamación, por ejemplo, la naturaleza e intensidad de la lesión, localización, los tejidos afectados, y la respuesta del anfitrión. Todos los procesos inflamatorios agudos evolucionan de una de las tres formas siguientes:

Evolución de la inflamación aguda:

- I. Resolución completa: Cuando la lesión es limitada o de duración breve, cuando la destrucción de los tejidos es pequeña y cuando el tejido es capaz de regenerarse, lo más habitual es el restablecimiento histológico y funcional.
- II. Cicatrización o fibrosis: Ocurre cuando la inflamación tiene lugar en tejidos que no se regeneran o después de la destrucción sustancial de los tejidos.
- III. Progresión de la respuesta a inflamación crónica: Ocurre cuando la respuesta aguda no puede resolverse, sea por la persistencia del agente lesivo o por la interferencia del proceso normal de cicatrización.

2.1.3 Modelos experimentales de inflamación

Existen protocolos establecidos para evaluar inflamación aguda y crónica en modelos experimentales. 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. A continuación se explicará uno de estos modelos (Winyard y Willoughby, 2003).

Inducción de edema plantar por carragenina en ratas y ratones

Descrito por Winter *et al.* (1962) y posteriormente modificado por Sugishita *et al.* (1981). Consiste en la administración subcutánea de una solución de λ -carragenina, un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus*, a nivel de la aponeurosis plantar de la rata o ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio medida por la liberación de diversos autacoides. Previamente se administra la sustancia que posiblemente provoque una disminución de la respuesta inflamatoria (Sueiro, 2011).

2.1.4 Fitoterapia antiinflamatoria

Los antiinflamatorios esteroideos tienen un importante rol en la acción antiinflamatoria debido a que inhiben la producción de varios factores celulares como las citocinas o reactantes de la fase aguda, los cuales son críticos en la generación de la inflamación, dando como resultado la disminución de la liberación de factores quimiotácticos y vasoactivos. Actúan atravesando la membrana citoplasmática e interactuando con receptores específicos que se encuentran en el citoplasma de las células

de los tejidos diana. Los esteroideos son los más potentes antiinflamatorios porque inducen la expresión de la macrocortina o lipocortina que es una proteína que inhibe la fosfolipasa A₂ interfiriendo la producción de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (sustancias proinflamatorias). De esta manera se disminuye su síntesis y su liberación (Betés y al., 2008). Se han elaborado fármacos esteroideos entre los que se encuentran la dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona (Carrillo y González, 2002).

Los AINEs son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX). En este grupo de fármacos se encuentran el paracetamol, morfina, ibuprofeno, pirrolacético entre otros (Carrillo y González, 2002).

Debido a las diferentes patologías que pueden padecer los individuos, algunas temporales y otras crónicas, y el consecuente consumo de fármacos para eliminar o minimizar estos padecimientos, se ha elevado el índice de reacciones adversas. Por lo que, las recientes investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural, empleando modelos farmacológicos (Setty y Sigal, 2005).

El potencial antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze fue determinado por el método de inducción de edema

plantar en ratas por λ -carragenina (Nuñez *et al.*, 2016). En extractos de hojas de *Annona squamosa* (L.) Delile. se demostró el efecto antiinflamatorio evaluado en granuloma inducido por algodón en ratas (Amador *et al.*, 2006). Utilizando el mismo modelo experimental se comprobó que el extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) posee efecto antiinflamatorio en ratas (Arauco, 2016).

Además de estos extractos, se han aislado metabolitos secundarios a los que se les ha comprobado su efecto antiinflamatorio. Extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. presentaron actividad antiinflamatoria utilizando el modelo murino de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (Franco *et al.*, 2007). Se comprobó la actividad antiinflamatoria de los extractos, fracciones y subfracciones de *Aristolochia chilensis* Mol. (Stuntz) en oreja de rata a través de la inducción con TPA (Activador Tisular del Plasminógeno) (Cespedes *et al.*, 2010).

2.2 Género Agave

2.2.1 Generalidades

Los agaves presentan un alto contenido de sólidos, alrededor del 33 %. Los fructanos representan aproximadamente el 70 % de los sólidos solubles. Estos compuestos son de gran importancia para la obtención de jarabes y otras sustancias. La composición química queda distribuida de la siguiente manera: 62 % de humedad, 11 % de celulosa, 22 % de fructano y 5 % de lignina. Se han encontrados azúcares en cantidades considerables. El 75 % de fructosa, el 20 % de glucosa y el 5 % de insulina (González y Pérez, 2014).

Los agaves representan un grupo de plantas suculentas, originados en América tropical y subtropical, incluyendo los países del Caribe. Las tierras altas de Mesoamérica parecen ser el núcleo original de los agaves cultivados. (Elorza *et al.*, 2011).

El género fue establecido por Linneo en 1753. Posteriormente, el general prusiano Georg Albano von Jacobi describió 78 especies basándose en ejemplares cultivados en jardines en Europa, muchos de los cuales eran plantas en estados juveniles. Al final del siglo, George Engelmann y John G. Baker, revisaron varias especies, añadiendo 31 más a la lista (González y Pérez, 2014).

En 1915 Alwin Berger publicó su trabajo definitivo sobre el género, describió 274 taxones y organizó todo el género taxonómicamente. Trabajó con material vivo, cultivado en el jardín de La Mortola, en la Riviera Italiana, famoso por su colección de *Agave*, y otros géneros relacionados. Berger fue contemporáneo de William Trelease, del Missouri Botanical Garden, que fue el primer botánico que estudió los agaves en su hábitat nativo. Entre Berger y Trelease describieron 310 especies (Irish y Irish, 2000).

Desde el punto de vista morfológico, poseen hojas alargadas dispuestas en espiral, sobre un corto y a menudo invisible tallo, formando una roseta. Esta morfología es una adaptación destinada a captar agua por las hojas, que es transportada a la zona

radical. Las hojas en general son duras, o al menos rígidas, y muy fibrosas. Numerosas especies poseen dientes marginales prominentes y, en la mayoría, existe una espina terminal rígida. El número de hojas por roseta varía de 20 a 200, dependiendo de la especie. La mayoría posee una cutícula dura, una adaptación para prevenir la pérdida de agua en zonas desérticas. El margen foliar puede ser liso, interrumpido por dientes o con fibras alargadas denominadas filamentos. La espina terminal puede ser alargada o corta, recta, curvada o cilíndrica, con o sin excavación basal, pero en la mayoría de los casos punzante. La presencia o ausencia de este carácter, así como su longitud puede ser utilizado a la hora de diferenciar algunos taxones. El color varía de verde brillante a gris – azulado intenso (Irish y Irish, 2000). Las hojas viven durante mucho tiempo, 12-15 años, a menudo durante el ciclo completo del individuo.

El tallo en general es pequeño, formando solo unas pocas especies troncos de tamaño significativo. Los rizomas son comunes, con rosetas a lo largo de estos, que pueden formar colonias de carácter clonal. Las raíces son fibrosas, con crecimiento radial.

Las flores cuentan con seis tépalos, en general de color amarillo o dorado, pero también blanco y rojo. Los tépalos están soldados en la zona inferior, en un tubo, y posee una constricción sobre el ovario, con numerosos óvulos. Los estambres son seis, exsertos, con anteras aplanadas. La inflorescencia es una panícula y se forma en la mayoría de las especies en el ápice de la roseta. El fruto es una cápsula y permanece en la planta durante meses. Las semillas son de color negro, aplanadas y numerosas (Guillot y Der, 2006, González y Bolívar, 2014).

2.2.2 *Agave brittoniana* Trel

2.2.2.1 Distribución

La población observada y única conocida se encuentra en la región central de Cuba, a pocos metros de la carretera que se sitúa de Cienfuegos a Trinidad y se compone de unas decenas de individuos. La población local utiliza sus hojas en el lavado de ropas y puede considerarse como una especie amenazada o, al menos, vulnerable.

2.2.2.2 Descripción botánica y taxonomía

Es ubicada en el Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: Equisetopsida, Subclase: *Magnoliidae*, Superorden: *Liliana*, Orden: *Asparagales* Familia: *Asparagaceae*, Género: *Agave* y Especie: *A. brittoniana* Trel (2018). Dentro del *A. brittoniana* existen tres subespecies descritas: subsp *brittoniana*, subsp *brachypus* y la subsp *sancti-spirituensis* (Alvarez, 1996). El género posee las siguientes características.

Son plantas de contorno hemisférico y tienen tallos cortos, norizomatoso. Las hojas son muy anchas, lanceoladas, abruptamente agudas hacia el ápice y poco cóncavas. Son de color verde, a veces algo grisáceos y lustrosos. El mucrón puede ser desde recto a ligeramente curvo. Las espinas marginales son rectas o mayormente curvas.

Las flores pueden ser amarillas y verdosas en el dorso de los segmentos y el ovario. Las Semillas pueden ser desde hemicirculares a subtriangulares. No produce bulbillos.

Florece de enero a marzo y fructifica hasta mayo. Se cultiva en el macizo de Guamuhaya y en las alturas de Santa Clara sobre suelos pedregosos, esquistosos, cuarcíticos y serpentinosos, desde 100 a 1000 m, participando en diversas formaciones vegetales, desde bosques siempre verdes, bosques pluviales montañosos, hasta matorrales xeromorfos. La especie es polimorfa, muy abundante que prolifera y se disemina con fuerza en lugares antropizados de las serranías, al resistir el fuego y la erosión (Alvarez, 1996).

Estudios anteriores demuestran que la especie presenta en sus hojas yucagenina, diosgenina, hecogenina y tigogenina (Cuellar y Diaz, 1979). Alemán y Roque (1973) encontraron que la yucagenina en esta especie constituye el 85 % de las sapogeninas presentes y que la diosgenina solo está en forma de trazas.

***Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel.) A. Álvarez**

Esta subespecie se distingue de la típica, por los mucrones de las hojas, comúnmente con espínulas en el canalículo, inflorescencia algo más laxa y las flores con menor talla. Los frutos por lo regular son más cilíndricos. Los pedicelos no eran tan pequeños como suponía Trelease, carácter que sirvió de inspiración al nombre de la variedad Alvarez (1996).

Es oriunda de la región central de Cuba. Crece en la conocida zona protegida Cubanacán, aledaña a la ciudad de Santa Clara. También se puede encontrar en el Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

2.2.3 Antecedentes de estudios antiinflamatorios del género *Agave*

Las plantas del género *Agave* han sido muy estudiadas por sus potencialidades biológicas, dentro de estas se encuentra el poder antiinflamatorio. El extracto hidrolizado de *Agave sisalana* Perrine mostró efecto antiinflamatorio en modelo de edema plantar inducido por carragenina y en granuloma inducido por discos de algodón en roedores (Dunder *et al.*, 2010). Extractos acetónicos de *Agave tequilana* F.A.C. Weber y *Agave americana* L. mostraron efecto antiinflamatorio en modelo de edema inducido en oreja de ratones, con mayor efectividad para la especie *A. americana* (Monterrosas *et al.*, 2013). El extracto acetónico de la penca de *Agave angustifolia* Haw y las fracciones derivadas de este ejercen un efecto antiinflamatorio usando un modelo de artritis experimental en ratón albino (García, 2017).

2.2.4 Fitoquímica

La fitoquímica es la ciencia que ha permitido la detección y posteriormente la identificación de los principios activos responsables de alguna propiedad atribuida a alguna planta. Tal es el caso de la familia *Asparagaceae*, que se caracteriza por presentar en su composición un alto contenido de fibra, constituida por ceras,

polialcoholes, poliazúcares (Ortega y Theilkuhl, 1969). También estudios previos han detectado la presencia de aminas y/o aminoácidos, grasas, aceites esenciales y esteroides (Agrawal *et al.*, 1985). Además, numerosas especies de agaves contienen dentro de sus metabolitos secundarios saponinas esteroidales, las que en dependencia de su estructura pueden presentar múltiples acciones farmacológicas, entre las que se encuentran sus propiedades antiinflamatorias (Hernández *et al.*, 2005) como es el *A. brittoniana*.

Las saponinas son glicósidos, en los cuales varias unidades de monosacáridos se unen mediante enlace glicosídico a un resto denominado aglicón o sapogenina. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroideal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales.

Las sapogeninas esteroidales poseen el esqueleto base tetracíclico característico de los esteroides, con la particularidad de que la cadena lateral que se origina a partir de C-17, puede adoptar varias formas (Guerra, 2005).

Las sapogeninas esteroidales en forma libre aparecen comúnmente en diferentes familias. En el caso de las plantas del género *Agave* se han aislado y caracterizado gran cantidad de compuestos de este tipo, entre los que se pueden citar Hecogenina, Tigogenina, Manogenina, 9-Dehidrohecogenina, Smilagenina, Yamogenina, Sarsapogenina, Diosgenina, Rockogenina, Neotigogenina, Gloriotigenina, Gentrogenina, Sisalagenina, Avogenina, Texogenina, Esmilagenina, Tigonina y Clorogenina (Guerra, 2005, Cervantes, 2016).

2.2.4.1 Identificación y aislamiento de saponinas y sapogeninas

Las saponinas poseen elevado peso molecular, y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. Son solubles en agua, etanol y metanol diluidos y en caliente. Las sapogeninas son prácticamente insolubles en H₂O, solubles en solventes poco polares como CCl₄ y éter (Guerra *et al.*, 1999).

El procedimiento que se ha usado para las extracciones es el descrito por Marker *et al.* (1943). Primero se desengrasa el material vegetal, que permite eliminar los lípidos mediante extracciones a partir del material seco con solventes de diferentes polaridades, tales como metanol, etanol y n-butanol.

La hidrólisis de las saponinas generalmente se realiza por vía química utilizando un ácido mineral como catalizador y tendría como finalidad liberar las sapogeninas. Estas sapogeninas se extraen utilizando solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo.

Para el aislamiento y purificación de estos productos se usan las técnicas cromatográficas; dentro de las que se destacan la cromatografía en capa delgada (CCD); método rápido y sencillo que permite hacer un análisis cualitativo de los compuestos de interés y la cromatografía en columna, en la que se utilizan adsorbentes como alúmina y sílica gel (Fukuhara y Kubo, 1991).

Existen métodos colorimétricos para determinar la presencia de saponinas en un extracto. La prueba de Lieberman- Burchard, identifica saponinas esteroidales; y el de Wholer, que es específico para saponinas triterpenoides. Además, es muy conocido el ensayo de la espuma, en el que se produce una espuma persistente al ser agitadas las soluciones acuosas (Flores *et al.*, 2013).

2.2.4.2 Yucagenina

Se conoce como 25R-espirost-5-en-2 α , 3 β -diol (Fig. 1). Su fórmula química es C₂₇H₄₂O₄. Además de haberse encontrado en *Agave brittonina*, se ha aislado de otras plantas. De las hojas del *Cestrum taylori* Britton & P. Wilson fueron aislados dos esteroides, que se identificaron a partir de sus datos espectroscópicos, dentro de ellos la yucagenina (Ferrer *et al.*, 2016). También ha sido encontrada en *A. lechuguilla* (Cardenas, 2007) y *A. americana* (Cervantes, 2016). De los frutos de *Solanum jamaicense* Mill. fueron aislados e identificados nueve compuestos esteroidales, por medio de cromatografía de capa delgada y espectroscopia, dentro de estos se encontró la yucagenina (Ferrer *et al.*, 2018).

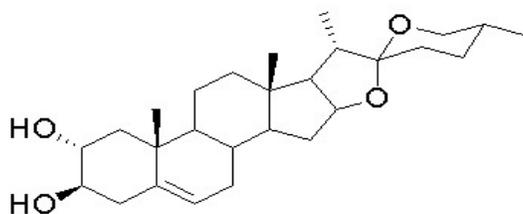


Figura 1. Yucagenina: 25R-espirost-5-en-2 α , 3 β -diol

2.3 Actividad Antiinflamatoria de saponinas y sapogeninas

Saponinas aisladas de diferentes especies de plantas han mostrado actividad antiinflamatoria. Escina, saponina aislada de *Aesculus hippocastanum* L. mostró una significativa actividad antiinflamatoria reduciendo el granuloma en ratas (Sur *et al.*, 2001). Wei *et al.* (2004) aislaron seis saponinas dentro de ellas: escina la, escina lb, isoescina la, isoescina lb de semillas de *Aesculus chinensis* Bunge, planta medicinal de China y se demostró la actividad antiinflamatoria de estas saponinas que mostraron mayor actividad que el extracto en ratones (Sirtori, 2001). Piscetoside A fue aislada de *Kalopanax pictus* (Thunb.) Nakai y mostró un efecto antiinflamatorio significativo con una dosis oral de 50 mg/ml mediante la prueba de permeabilidad vascular (Da *et al.*, 2002). El efecto antiinflamatorio *in vivo* de una nueva saponina esteroide, mannoside A, y derivados de esta, aislados de *Dracaena mannii* Baker fueron comprobados en animales de experimentación (Tapondjou *et al.*, 2008).

La Diosgenina, sapogenina que en diferentes plantas se ha comprobado el efecto antiinflamatorio. En un estudio en roedores desarrollado por Punitha *et al.* (2013), en

el que se utilizó el modelo de edema plantar inducido por carragenina, la disogenina aislada a partir de *Tinospora* malabárca (Lam.) Hook. f. & Thomson mostró un efecto antiinflamatorio significativo.

En el género *Agave*, estudios previos han comprobado la actividad antiinflamatoria de las saponinas y sapogeninas. La hecogenina y tigenonina aislada de *A. americana*, induce mayor actividad antiinflamatoria que el extracto acuoso e incluso más que el antiinflamatorio esteroidal, dexametosona, en el modelo de la carragenina inducida por edema sub- plantar en ratas (Peana *et al.*, 1997). Una sapogenina esteroidal aislada de *A. attenuata* Salm-Dyck mostró actividad antiinflamatoria mediante el ensayo de permeabilidad capilar (da Silva *et al.*, 2002). La cantalasaponin-1, saponina esteroidal extraída de *A. angustifolia*, mostró un efecto mayor al 90 % de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en la oreja en ratones (Monterrosas *et al.*, 2013).

2.4 Estudios QSAR en el diseño molecular

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 y 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 y Consonni, 2008). En estos métodos, se utilizan múltiples descriptores moleculares de la estructura química combinados con la aplicación de técnicas quimiométricas para derivar modelos.

2.4.1 Metodología general empleada en los estudios QSAR

Los principios de la metodología QSAR pueden describirse mediante los siguientes pasos comunes: 1) Formulación del problema, en este paso se determina el objeto de análisis y el nivel de información requerido, 2) Parametrización cuantitativa de la estructura molecular de los compuestos químicos orgánicos/secuencia de biopolímeros, 3) Medición de la propiedad de interés ('efectos biológicos'), 4) Escoger el tipo de modelo QSAR que se va a desarrollar, 5) Selección de los compuestos (diseño estadístico de la serie), 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 diseño/descubrimiento de un nuevo compuesto líder, desarrollando procedimientos de tamizaje virtuales. Sin embargo, el desarrollo de cualquier QSAR es un ciclo interactivo (Castillo, 2008).

2.4.2 Descriptores de la estructura química

Los descriptores moleculares (DMs) o índices moleculares (IMs) como también se le conocen son términos útiles que caracterizan un aspecto específico de una molécula y contienen información estructural derivada de la representación estructural de las moléculas bajo estudio. La naturaleza de los descriptores, depende de cual haya sido

el proceder utilizado para la definición de los mismos, pudiendo tener en cuenta rasgos topológicos (2D), geométricos (3D), y electrónicos de las moléculas. Algunos de estos descriptores, sin embargo, tienen ‘más información’ de propiedades físico-químicas que de los rasgos estructurales de la molécula. Estos incluyen los basados en la determinación experimental de propiedades físico-químicas, tales como la mayoría de las constantes de los sustituyentes, hidrofóbicas, electrónicas y estéricas (Todeschini y Consonni, 2008).

El término útiles tiene aquí un doble significado: o sea que estos números pueden brindar una visión más amplia en la interpretación de las propiedades moleculares y/o son capaces de tomar parte en un modelo para la predicción de propiedades moleculares de interés. En este sentido, si la interpretación del DM fuera débil, provisional, o carente completamente de significado, aún el mismo pudiera estar fuertemente correlacionado con alguna propiedad molecular, lo cual sería de gran utilidad para la generación de modelos con alta capacidad predictiva. Por otra parte, los descriptores con un poder predictivo pobre se pudieran retener en los modelos cuando están bien fundados teóricamente y son, por ende, interpretables debido a su capacidad de codificar la información química estructural. De acuerdo a la naturaleza en su definición y a la complejidad de los rasgos moleculares estructurales que codifican, los DMs se clasifican de forma general según las dimensiones que abarcan en: Descriptores Constitucionales (0D), Unidimensionales (1D), Bidimensionales (2D) y Tridimensionales (3D) (Todeschini y Consonni, 2008).

2.4.3 Los Métodos Quimiométricos en los estudios QSAR

La Quimiometría es una disciplina que recopila herramientas matemáticas y estadísticas para tratar con bases de datos químicas complejas (Vandeginste *et al.*, 1998, Brereton, 2004). En esta disciplina, las estrategias de caracterización principales son: los enfoques multivariados al problema en cuestión, la búsqueda de información relevante, la validación de los modelos para derivar objetos matemáticos con altos poderes predictivos, la comparación de los resultados obtenidos por diferentes métodos, y, la definición y uso de criterios capaces de medir la calidad de la información extraída y los modelos obtenidos.

La Quimiometría presta atención: al poder predictivo de los modelos (el cual se estima con técnicas de validación), a la complejidad del mismo, y, a la continua búsqueda de parámetros adecuados para evaluar la calidad de dichos modelos; tales como los análisis de clasificación y de regresión. La Quimiometría hoy en día se intercepta no solo con varios campos de la Matemática y la Estadística clásica sino también de la Inteligencia Artificial (IA).

2.4.3.1 Métodos de clasificación

Los métodos de clasificación se utilizan para la asignación de objetos a una de varias clases basado en una regla de clasificación. Son métodos de aprendizaje supervisado, pues se “aprende” a partir de una serie de casos con variables predictivas y función “objetivo” o variable dependiente también conocida (esta serie de entrenamiento es el “maestro o supervisor”). Tal es el caso también del clásico

método de regresión; solo que en los problemas de clasificación la función objetivo o variable dependiente es discreta (nominal u ordinal); i.e. es una clase. El objetivo de tales técnicas es calcular una regla de clasificación (y, posiblemente, límites de clases, o probabilidades de pertenencia a una clase), basados en los objetos de la serie de entrenamiento y aplicar esta regla para asignar una de estas clases, a objetos de clases previamente desconocidas (Hand, 1981, Frank y Friedman, 1989, Hand, 1997). El método ha sido usado para modelar varias respuestas QSAR, como por ejemplo: compuestos activos/no-activos, compuestos de toxicidad baja/mediana/alta, compuestos mutagénicos/no-mutagénicos, etc.

Los métodos de clasificación de origen estadístico más populares son: Análisis Discriminante Lineal (ADL); Análisis Discriminante Cuadrático (ADQ); Análisis Discriminante Regularizado (ADR); k -ésimos Vecinos más Cercanos (kNN por sus siglas en inglés); Métodos de Árboles de Clasificación (CTs por sus siglas en inglés), también conocidos en la literatura como DT, acrónimo de *Decision Trees*; los Clasificadores de Función Potencial (CFP); los Clasificadores Medios más Cercanos (CMmC) y los Clasificadores Medios más Cercanos Ponderados (CMmCP).

Árboles de Clasificación

Se ha sugerido otro enfoque para el análisis discriminante, este es precisamente el aprendizaje usando árboles de decisión. Es un método de aproximación de funciones objetivos de valores discretos, en el cual la función aprendida se representa por un árbol en el cual intervienen las posibles variables predictivas y sus interacciones. Este procedimiento lo propusieron Breiman, Friedman, Olshen y Stone (1984) en el libro titulado *Classification and Regression Trees*. Los árboles obtenidos pueden ser representados como conjuntos de reglas “si-entonces” (*if-then*).

Un árbol de decisión es un grafo acíclico donde cada nodo especifica una prueba de algún rasgo y cada arco que sale del nodo corresponde a alguno de los valores posibles del rasgo que representa ese nodo. Estos árboles clasifican casos no conocidos comenzando por la raíz del árbol, probando el rasgo especificado en el nodo y en dependencia del valor de ese rasgo se mueve al próximo nodo. Este proceso es repetido entonces hasta alcanzar un nodo hoja o terminal que define la clasificación (Mitchell, 1997).

Según la literatura el algoritmo más clásico para construir árboles de decisión es el ID3 (Quinlan, 1986) pero este algoritmo no trabajaba para atributos continuos y el propio autor sugiere una variante, el C4.5, que usa puntos de corte e introduce varias medidas para evitar el sobre entrenamiento, en particular los criterios de parada de la división y de poda del árbol. El criterio básico de parada de la división se basa en detener el desglose del árbol cuando el número de objetos asignados al nodo hijo están por debajo de determinado umbral. El segundo criterio, poda, simplifica el árbol eliminando subárboles que conducen a una misma conclusión sobre la clasificación, técnica también conocida como *reduced error pruning*. Hoy en día existen muchos otros algoritmos e implementaciones, de construcción de árboles de decisión; CHAID (*Chi-square Automatic Interaction Detector*), *Exhaustive* CHAID; y también existen

muchos otros criterios de parada o poda. Ellos han sido utilizados con bastante eficiencia en la solución de problemas bioinformáticos.

2.4.4 Investigaciones realizadas para predecir la actividad antiinflamatoria

Muchos investigadores se han enfocado en el uso de métodos computacionales para la predicción de la actividad biológica. Con este objetivo emplean bases de datos compuestas por diferentes moléculas a las cuales se les ha determinado la actividad de interés, ejemplo de esto son los estudios QSAR, a continuación, se citan algunos trabajos realizados.

Se estudió la actividad antiinflamatoria de 4-amino-2,6-diarilpirimidina-5-carbonitrilos; encontrándose dos nuevas moléculas que eran tan activas como otras que se les conocía su actividad. Luego se sintetizaron en condiciones de laboratorio y además se evaluaron experimentalmente comparándose con las otras y una de ellas mostró ser un cinco por ciento más potente (Silva *et al.*, 2008).

Investigadores de la India desarrollaron un estudio 2D-QSAR de derivados de la pirazolona con actividad antiinflamatoria. Se demostró buena correlación entre las variables predictivas y la actividad inhibitoria frente a la ciclooxigenasa. El modelo evaluado mostró un valor de r^2 igual a 0.956 y un error estándar 0.004. Se concluyó que nuevos sustituyentes al núcleo de la molécula pudieran ser útiles para el desarrollo de agentes antiinflamatorios más potentes (Antre *et al.*, 2012).

Se evaluó un modelo QSAR usando 21 compuestos con actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa-2, mostrando como resultado un valor de $r^2 = 0.911$ y un error estándar 0.062. Los compuestos sintetizados de naftalimida ditiocarbamato fueron evaluados en el modelo y experimentalmente encontrándose una buena correlación entre la propiedad predicha y la observada. Los compuestos 4c (1,3-dioxo-1H-benzo [de]isoquinolin-2(3H)-il) etilo hexadecil carbamo-dithioate) y 4d (1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-il)etil1,4'-bipiperidina-1'-carboditioato) revelaron una potente propiedad antiinflamatoria en comparación con el fármaco celecoxib comprobado mediante estudios QSAR y biológicos (Zahra *et al.*, 2016).

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

El efecto antiinflamatorio de yucagenina presente en *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* se comprobó mediante estudios *in silico* e *in vivo*. Mediante los estudios *in silico* se obtuvo un modelo computacional para identificar compuestos con potencial acción antiinflamatoria. El modelo desarrollado fue empleado en la predicción de la actividad antiinflamatoria de las diferentes sapogeninas presentes en *Agave*, entre las cuales se encuentra la yucagenina. Paralelamente a este estudio, se trabajó en los laboratorios de química orgánica para obtener fracciones ricas en esta sapogenina. Posteriormente el crudo de sapogeninas y una fracción rica en yucagenina fueron evaluadas en modelos experimentales *in vivo* de inflamación. A continuación se abordarán estos temas más detalladamente.

3.1 Predicción de la actividad antiinflamatoria de sapogeninas esteroideas utilizando modelos QSAR

Todos los cálculos se realizaron en un PC Core-i5-2500- 3.30 GHz. El módulo **CARD**D (siglas en inglés de **C**omputed-**A**ided '**R**ational' **D**rug **D**esign), implementado en el programa **TOMOCOMD** (Marrero y Romero, 2002) (siglas en inglés de **T**Opological **M**olecular **C**OMputer **D**esign), se usó para el cálculo de los DMs. El análisis estadístico se efectuó empleando el paquete de procesamiento STATISTICA 8.1 (Inc, 2001) y el *Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA 3.6)* (H.Witten y Frank, 2005). Los datos se almacenaron y procesaron utilizando el programa de Microsoft Excel 2007.

3.1.1 Base de Datos empleada en el estudio QSAR

La base de datos empleada está conformada por 1064 compuestos, obtenida de Mota *et al.* (2015). De los cuales 602 son compuestos con acción antiinflamatoria (lográndose una adecuada representatividad de diferentes núcleos estructurales y mecanismos de acción antiinflamatorios) y 462 tenían otras actividades farmacológicas. Esos compuestos se dividieron en serie de entrenamiento (SE) con 794 compuestos y serie de predicción (SP) con 265 compuestos haciendo uso de Análisis de Clúster. Se cribaron una serie de 18 estructuras entre saponinas y sapogeninas con el objetivo de predecir su actividad.

3.1.2 Programas empleados

3.1.2.1 TOMOCOMD

Se empleó el programa interactivo para el diseño molecular e investigaciones químio-bioinformáticas denominado **TOMOCOMD** que fue desarrollado en la Universidad Centra "Marta Abreu" de Las Villas.

En este paquete computacional se implementó el cálculo de varias familias de descriptores moleculares, basados en representaciones vectoriales y matriciales de la estructura molecular. El programa está compuesto por cuatro sub-programas, cada uno de ellos con un módulo de visualización y otro de cálculo. Se usó el subprograma **CARD**. Este 'software' fue desarrollado basado en una interface amigable con el usuario, el cual no tiene que dominar *a priori* ningún conocimiento de programación computacional. Específicamente, en este trabajo se utilizaron los índices lineales totales y locales de la matriz de adyacencia entre vértices del pseudografo usado para la representación de la estructura química de las moléculas. Se emplearon los índices lineales basados en relaciones de átomos.

Con el objetivo de diferenciar los vértices (átomos) de los grafos moleculares, cinco sistemas de propiedades atómicas (etiquetas) fueron considerados como componentes vectoriales en el cálculo de los DMs. Con tal propósito se usaron valores de masa atómica (M), polarizabilidad atómica (P), volumen de van der Waals (V) y electronegatividad en la escala de Mulliken (P) y en la escala de Pauling (G). El conjunto de índices totales y locales computados para esta familia de descriptores moleculares es una caracterización única de cada compuesto y se utilizaron como variables independientes en la parametrización de la estructura química para el desarrollo de los modelos QSAR (Brito, 2011).

3.1.2.2 STATISTICA

El STATISTICA es un software de análisis comprensivo de datos integrados que contiene gráficos, dirección de la base de datos y posee un sistema de desarrollo de aplicación personalizada que ofrece una amplia selección de elementos esenciales para el análisis estadístico y procedimientos analíticos avanzados. Además, proporciona el acceso a un arsenal poderoso de tecnologías las cuales, no se necesitan conocer, debido a que el programa está diseñado para trabajar automática e intuitivamente (StatSoft, 2001). Este software fue usado para la división de la data en SE y SP, a partir de un análisis de conglomerados de *k*-medias.

3.1.2.3 WEKA

El WEKA es una plataforma diseñada para el aprendizaje automático y la minería de datos programado en *Java* y desarrollado en la Universidad de Waikato (Azuaje, 2006). El paquete contiene una colección de herramientas de visualización y algoritmos para análisis de datos y modelado predictivo, unidos a una interfaz gráfica donde el usuario puede acceder fácilmente a sus funcionalidades. Se ha convertido en un software de elección pues está disponible libremente bajo la licencia pública general, al estar implementado en *Java* puede correr en muchas plataformas. Además, contiene una extensa colección de técnicas para pre-procesamiento de datos y modelado; es fácil de utilizar por un principiante gracias a su interfaz gráfica de usuario (Reutemann *et al.*, 2004). Este software fue usado para el desarrollo de los árboles de clasificación.

3.1.3 Análisis quimiométrico

Análisis de conglomerados (análisis de clúster o AC)

En el desarrollo del trabajo se empleó otra técnica estadística conocida como: análisis de conglomerados. El análisis de conglomerados (en inglés cluster) permitió agrupar los casos o variables de un archivo de datos en función del parecido o similitud existente entre ellos. Como técnica de agrupación de casos permitió detectar el número óptimo de grupos y su composición únicamente a partir de la similitud; además no asume ninguna distribución específica para las variables.

Esta técnica es similar al análisis discriminante. Sin embargo, el análisis discriminante efectúa la clasificación tomando como referencia un criterio o variable dependiente (los grupos de clasificación). El método utilizado fue el conocido como *k-medias*, que agrupó casos según su cercanía al centroide (centro multivariado del conglomerado) del conglomerado más cercano; así continuó la lectura secuencial del archivo de datos asignando cada caso al centroide más cercano y actualizando el valor de los centroides a medida que se incorporan nuevos casos. El proceso terminó cuando todos los casos fueron asignados a uno de los *k-ésimos* conglomerados (Pérez, 2008).

3.1.4 Árbol de Clasificación J48

En este estudio se empleó el árbol de clasificación J48 implementado en el WEKA, el cual constituye un algoritmo, cuyo parámetro más importante es el factor de confianza (c) que controla el tamaño del árbol de decisión construido (en este caso fue 0.10). Se variaron parámetros tales como: el número de hojas y nodos, este parámetro no es posible controlarlo directamente, pero cuanto más pequeño es, más simple tiende a ser el clasificador. También se varió el número de casos por hoja para evitar el sobreajuste, en este caso se limitó a un mínimo de cuatro casos por hoja.

3.2 Actividad antiinflamatoria de fracción rica en yucagenina en modelo agudo *in vivo*

3.2.1 Obtención de fracciones ricas en yucagenina

En el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, se separó, a partir de un crudo de sapogeninas de *A. brittoniana*, una fracción rica en yucagenina. Posteriormente se realizaron estudios experimentales farmacológicos en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, con el objetivo de comprobar el efecto antiinflamatorio de esta fracción. Los trabajos extractivos y experimentales se desarrollaron en el período comprendido entre enero del 2017 y abril del 2018.

Equipos e instrumentos de medición

- Balanza técnica digital (Sartorius, Alemania Modelo: BS2202S.)
- Estufa (Binder, EEUU Modelo: EB0386903)
- Molino de cuchillas (IKA® -MF 10 basic, Alemania)
- Rotoevaporador (IKA® Modelo: RV10BS1)
- Horno Mufla (B-170, Alemania)
- Destilador de agua automático (PN 1430 Selecta, España)
- Patrón de Diosgenina cortesía del Grupo de Productos Naturales de la UH/Cuba

Reactivos empleados

Todos los disolventes (n-butanol 98.9%, n-hexano 99% y acetato de etilo 99%, etanol 70%) y reactivos (H₂SO₄ 50%, HCl) son de las firmas MERCK y Panreac. En la cromatografía de columna se usó como fase estacionaria Sílicagel (SiO₂) con granulometría de 70-230 mesh y para la CCD, placas cromatográficas (soporte de vidrio) Silicagel 60F254 (fase normal).

Recolección, identificación y selección del material vegetal

Las hojas de *A. brittoniana* 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 2017 y 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, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (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 UCLV (Anexo 1). 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.

Secado del material vegetal

Se le retiró la cutícula externa a las hojas y posteriormente se cortaron finamente para facilitar el proceso de secado en estufa a 40 °C según estudios previos (Vizcaino, 2017).

Obtención del extracto hidroalcohólico

Se utilizó el procedimiento establecido por Vizcaino (2017) que garantiza que los parámetros de calidad estén dentro de los rangos establecidos por la Norma Ramal de Salud Pública # 312: Extractos, fluidos y tinturas

Una vez que el material vegetal se secó y molinó, se procedió a la maceración del polvo fino, con 5 L de etanol al 70 %, protegido de la luz. Luego se decantó el líquido sobrenadante y se filtró adecuadamente, este proceso se realizó cuatro veces.

El extracto hidroalcohólico obtenido, se rotoevaporó en el Rotoevaporador, a 40 °C y presión de vapor, hasta obtener una mezcla pastosa que contenía el crudo de metabolitos. La mezcla se colocó en la estufa a 40 °C hasta su secado total.

Obtención del crudo de saponinas (fracción n-butanólica)

La obtención del crudo de saponinas se realizó según procedimiento establecido por Guerra (2005) y modificado por Fundora (2016). Se resuspendió en 500mL de agua destilada el extracto hidroalcohólico. Se colocó en un embudo separador añadiendo el mismo volumen de n-butanol saturado, realizando 3 extracciones con un tiempo de duración de 24 h entre ellas. Se comprobó la presencia de saponinas a través de la prueba de la espuma. Finalmente, la fase orgánica se rotoevaporó hasta sequedad total. El cálculo de los rendimientos en cada fase extractiva se expresó como porcentaje, teniendo en cuenta la masa extraída a partir de la total en el paso previo.

Obtención del crudo de sapogeninas por hidrólisis ácida

La muestra seca del extracto n-butanólico, se disolvió en etanol al 70% y 120mL de HCl 2mol/L (relación 1:1) y se calentó hasta la ebullición durante 3 h controlando la temperatura para evitar descomposición de la muestra.

La muestra obtenida se purificó realizando extracciones con acetato de etilo hasta que todas las sapogeninas pasaron a la fase orgánica usando un embudo separador. La comprobación de la hidrólisis se realizó en CCD utilizando como fase móvil acetato de etilo/n-hexano 1:1 y posteriormente como agente revelador se empleó H₂SO₄ 50 %. Finalmente el crudo de sapogeninas se concentró con el empleo del rotoevaporador.

Fraccionamiento del crudo de sapogeninas y obtención de fracción rica en yucagenina

Para la realización del fraccionamiento se escogió la columna de fase normal (silicagel de marca Sephadex). La columna cromatográfica se preparó por vía húmeda, añadiendo cuidadosamente en la columna de vidrio la silica-gel suspendida en el disolvente de elución (n-hexano/ acetato de etilo en la proporción 1:1, 1:2), cuidando la uniformidad del lecho para que no se formaran burbujas. Luego se adicionaron a la columna 2 g de la muestra en seco. Las fracciones fueron recolectadas en frascos, se reguló el tiempo de goteo de la columna para lograr el mismo volumen en cada fracción.

La comprobación de la separación en la columna se realizó por CCD fase normal utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano/acetato de etilo en relación 1:1 y el revelador que se utilizó fue H₂SO₄ 50 %.

3.2.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Reactivos y Materiales

- Indometacina, QUIMEFA, Cuba
- Carragenina, UNI-CHEM®.
- Solución Salina Fisiológica (SSF) 0.9 %, QUIMEFA, Cuba
- Carboximetilcelulosa UNI-CHEM®.
- Cánulas esofágicas
- Cristalería variada
- Cinta métrica

Se utilizaron ratas *Sprague Dawley*, machos, de peso corporal 170 ± 10 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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad controlada de 50 % a 70 % . Los animales y el alimento fueron recibidos con los respectivos certificados de calidad (Anexos 2 y 3).

El estudio se ejecutó según el método descrito en CYTED (Farmacéutica., 1995). Se formaron cinco grupos experimentales de seis animales cada uno. Se aplicaron dosis de 50 mg/kg del crudo de sapogeninas y dosis iguales de 20 mg/kg de fracción rica en yucagenina y diosgenina. El vehículo utilizado fue carboximetilcelulosa por la poca solubilidad en agua de las sapogeninas y la inocuidad que tiene esta sustancia en estudios farmacológicos (Fritz y Becker, 1981). El grupo control recibió agua destilada y el control positivo indometacina (7mg/kg) como agente antiinflamatorio. En todos los casos las sustancias fueron administradas por vía oral, empleando cánula intragástrica, con 12 a 18 h de ayuno. Una hora después de la administración oral en los diferentes grupos, se suministró 0,1 mL de una solución de carragenina (1%) en solución salina fisiológica en la aponeurosis plantar derecha posterior de la rata (Anexo 4).

El grosor de la pata inyectada se midió con ayuda de una cinta métrica antes y después de la inyección con carragenina (Anexo 5). Estas medidas se corresponden con los valores de inflamación reportados para este estudio.

El porcentaje de inflamación y de inhibición de la reacción inflamatoria de la γ -carragenina se calculó en la fase aguda a las 1, 2, 3, 4 y 5 h tras la inyección de la misma utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ inflamación } FA = \frac{X_{DI} - X_{AI}}{X_{AI}} * 100$$

Donde:

$\% \text{Inf } FA$ = Porcentaje de inflamación en la fase aguda

X_{AI} = Grosor de la pata en cm antes de la inducción

X_{DI} = Grosor pata en cm después de inducción

$$\% \text{inhibición } FA = \frac{X_{control} - X_{problema}}{X_{problema}} * 100$$

Donde:

$\% \text{inhibición } FA$ = Porcentaje de inhibición en la fase aguda

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

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

Se consideró la siguiente escala para clasificar el grado de actividad antiinflamatoria en: baja (15- 30 %), moderada (31-45 %), buena (46-60 %) y elevada (61 % o más) (Gonzales *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Los datos se procesaron por el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (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 %. Se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Mann Whitney para comprobar las diferencias entre los grupos ($p < 0,05$). La evolución de la inflamación en cada grupo se evaluó utilizando el test de Wilcoxon ($p < 0,05$).

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 impliquen 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

4. Resultados y Discusión

4.1 Predicción de la actividad antiinflamatoria de sapogeninas esteroideas utilizando modelos QSAR

Para obtener el árbol de clasificación se empleó la serie de entrenamiento; que permitió '*enseñar*' al modelo a reconocer los casos. Con el objetivo de desarrollar el modelo, se exploraron varias opciones variando los parámetros siguientes: factor de confianza utilizado para la poda y número mínimo de instancias por hoja. El mejor modelo encontrado tuvo un factor de confianza para la poda de 0.10 y el número de instancias por hoja fue de cuatro; se emplearon siete variables para el desarrollo del árbol. El árbol final se muestra en la Fig. 3. Luego se evaluó el desempeño del modelo en la serie de predicción (estos compuestos son nuevos para el modelo) y en dependencia de cómo se clasifiquen se puede saber si el modelo tiene un adecuado poder predictivo. Durante el desarrollo del modelo, 60 compuestos fueron identificados como '*outliers*' que se refiere a aquellos compuestos con comportamiento atípico según Lipnick (1991). El porcentaje comúnmente aceptado de '*outliers*' es de menos de un 10%, en este trabajo el mismo fue de 5,6%, quedando este por debajo del límite establecido por Estrada *et al.* (2000) y Pérez *et al.* (2004).

El parámetro de exactitud se refiere a la cantidad de compuestos que son clasificados correctamente siendo de un 86.97 % en la SE y 85.26 % en la SP; alcanzando valores de sensibilidad de 90.70% y 90.80% respectivamente. Este indicador representa el número de compuestos activos que son reconocidos por el modelo como activos, es decir que aproximadamente de cada 10 compuestos activos clasifica nueve correctamente. La especificidad está relacionada con los compuestos clasificados como activos y que son realmente activos, con valores de 86.90 % y de 85 % respectivamente. La diferencia entre los valores de cada serie es pequeña, considerándose como un buen modelo según las publicaciones especializadas del tema (Marrero *et al.*, 2006, Castillo *et al.*, 2015, Castillo *et al.*, 2017, Barigye *et al.*, 2018). La razón de falsos positivos hace referencia a la probabilidad de seleccionar un compuesto negativo (no antiinflamatorio) como positivo (antiinflamatorio), o sea un falso activo, en la serie de entrenamiento fue de 17.91% mientras que en la serie de predicción fue de 25%, valores que son aceptados según Morales *et al.* (2005) y Brito *et al.* (2013). No obstante, es deseable que el número de los compuestos falsos activos sea lo más pequeño posible según Estrada *et al.* (2000).

Se debe tener en cuenta que los compuestos empleados como inactivos, en este estudio, en realidad solo son compuestos a los que no se les conoce actividad como antiinflamatorios. Es decir, que algunos de los compuestos inactivos '*erróneamente*' predichos como activos pueden ser compuestos que tengan la acción antiinflamatoria pero que aún no se han identificado como tales. A su vez, el CCM (Coeficiente de correlación de Matthew) que presenta valores de 0.70 y 0.73 para SE y SP respectivamente, cuantifica la fuerza de la relación lineal entre los descriptores moleculares y las clasificaciones, y puede proporcionar a menudo una evaluación mucho más equilibrada de la predicción que, por ejemplo, los porcentajes globales de clasificación correcta. En la tabla I se muestran los parámetros estadísticos del desempeño del árbol para las series de entrenamiento, predicción y la validación cruzada (VC).

La validación del modelo mostró parámetros estadísticos similares a los de la serie de entrenamiento; la exactitud fue de 80.51% solamente un seis por ciento menor que la de la serie de entrenamiento. Además, los parámetros de sensibilidad y especificidad mostraron valores con una diferencia similar. Si se tiene en cuenta que la validación empleada (*10-fold-cross validation*) realiza perturbaciones menor al 10% al compararlo con la serie de entrenamiento se puede decir entonces que el modelo es estable y robusto según Brito *et al.* (2013) y Castillo *et al.* (2017).

El modelo se empleó en el cribado virtual de las sapogeninas esteroidales que están presentes en *Agave*. Como resultado del mismo la yucagenina y la clorogenina, fueron identificadas como potenciales agentes antiinflamatorios y por tanto se recomiendan para realizar los estudios experimentales que corroboren estas predicciones. La diosgenina según este modelo dio como no antiinflamatoria, sin embargo, esta sapogenina ha sido comprobada en otras plantas su efecto antiinflamatorio. Este resultado puede corresponderse a que el modelo tiene 15% de error en el parámetro de exactitud. Además, para estos estudios se crean varios modelos matemáticos para tener una información más completa de los resultados, pero debido al tiempo en que se realizó esta investigación y las áreas de estudios que abarcó no se pudieron obtener otros modelos. Los resultados del cribado se muestran en la Fig. 4. La clorogenina no será evaluada durante este estudio porque se encuentra en concentraciones bajas en la especie (Guerra, 2005).

4.2 Actividad antiinflamatoria de fracción rica en yucagenina en modelo agudo *in vivo*

Después de predecir la actividad antiinflamatoria de estas moléculas usando los métodos *in silico*, es de interés corroborar estos resultados en estudios *in vivo* para comprobar tanto las potencialidades de esta molécula como la veracidad del modelo creado.

4.2.1 Obtención de fracciones ricas en yucagenina

En el proceso extractivo se comenzó con 249,63 g del extracto hidroalcohólico obtenidos a partir de 1kg de droga seca y molinada. La tabla II muestra las cantidades relativas obtenidas durante la marcha fitoquímica.

El rendimiento obtenido hasta la fracción n-butanólica, fue superior en un 11.9 % a otros trabajos previos efectuados con la especie *Fundora* (2016), lo cual pudiera corresponderse al mayor tiempo de maceración y la cantidad de extracciones efectuadas en la obtención del extracto hidroalcohólico (cuatro) y el butanólico (tres). El rendimiento alcanzado en esta investigación constituye un referente en la obtención de las sapogeninas concentradas y sus fracciones.

Fraccionamiento del crudo de sapogeninas

Se obtuvieron 84 fracciones, en la mayoría de ellas ocurrió la precipitación de un sólido amorfo de color blanco, que según estudios previos realizados por Guerra (2005) se puede identificar como sapogeninas esteroidales. Las fracciones fueron monitoreadas tanto por el método visual como por CCD para agruparlas según su color y similitud cromatográfica.

La fig. 5 muestra tres placas cromatográficas corridas cada cinco fracciones. El resultado se muestra a partir de la fracción 31 quedando, descartado el volumen muerto de la columna. Las placas realizadas mostraron la presencia de un compuesto de coloración violeta intenso al ser revelado con ácido sulfúrico al 50%, de Rf igual a 0,62 que coincide con el Rf de la yucagenina, núcleo base de la sapogenina más abundante en la planta, resultado que coincide con otros investigadores (Alemán y Roque, 1973, Guerra *et al.*, 1999) Además se observaron dos manchas menos intensas en las primeras fracciones (31-55), una de ellas corresponde a la clorogenina con un Rf =0,48 y la otra a la diosgenina de Rf=0,81. El patrón de diosgenina utilizado confirmó la presencia de esta sapogenina, el resto fue identificado por los Rf que coinciden con Guerra *et al.* (1999).

La tabla III muestra las fracciones obtenidas después que se unieron, según los resultados cromatográficos. Finalmente quedaron tres fracciones, ricas en yucagenina, donde en la tercera fracción (50 mg), solo se identificó la yucagenina, según las condiciones cromatográficas empleadas.

El cromatograma de la Fig. 6 muestra la comparación entre las fracciones que se unieron y el patrón de diosgenina. Los resultados obtenidos confirman que la última fracción 56-84 (masa de 50 mg tiene un rendimiento de 2.5 % usando 2g del crudo sapogeninas) es la de mayor presencia de yucagenina con respecto a otras sapogeninas presentes en la especie. Esto explica que sea esta fracción la seleccionada para los estudios *in vivo*.

4.2.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Los valores medios del grosor de la pata derecha de los animales de cada grupo experimental, correspondientes al modelo agudo de inflamación inducido por carragenina, se muestran en la tabla IV.

Los datos reflejan la reproducción del modelo experimental, donde se observan valores significativamente superiores en el grupo control negativo a las 4 y 5 h post administración de carragenina en comparación con el grupo control positivo tratado con indometacina (test no paramétrico de Mann Whitney $p=0,009$).

El porcentaje de inflamación refleja el grado de inflamación con mayor precisión que los valores de medición directa. La tabla V refleja este parámetro para cada grupo experimental.

El análisis estadístico del porcentaje de inflamación mostró diferencias significativas a partir de la primera hora post administración del inductor inflamatorio y hasta el final del estudio (Kruskal Wallis $p<0,05$). Para comparar el efecto de los productos en estudio con respecto al grupo sin tratamiento se utilizó el test de Mann Whitney. Los valores obtenidos para la FRY y la diosgenina fueron menores al grupo control - durante todo el estudio. El grupo tratado con crudo de sapogeninas alcanzó valores inferiores al control a partir de la segunda hora. A los animales que se les administró indometacina, tienen valores de inflamación que están por debajo de los observados en el control negativo, esto coincide con estudios previos desarrollados por otros autores que emplearon este antiinflamatorio como control positivo Vicet (2009) y Yu *et al.* (2011).

El grupo de la FRY tuvo su porcentaje de inflamación durante todo el estudio con valores muy bajos al compararlos con el control negativo, aunque a las 5 h cuando finaliza el estudio se observan valores superiores, al compararlo con la primera hora (Test de Wilcoxon, $p=0,043$), resultan muy inferiores al grupo sin tratamiento e incluso al grupo de la indometacina. Resultados similares se aprecia en el grupo de la diosgenina, aunque en este grupo el ascenso en los valores del porcentaje de inflamación comenzó a las 4 h y continuó a las 5 h (Test de Wilcoxon, $p=0,027$ y $p=0,028$ respectivamente). En el grupo que se le administró el crudo de sapogeninas no se observan cambios significativos durante el curso del estudio. La indometacina tuvo un incremento significativo de la inflamación a las 3 h con respecto a los valores basales del grupo (Test de Wilcoxon, $p=0,039$), aunque este incremento fue significativamente inferior a los presentados en el grupo control – (tabla V).

En la tabla VI se exponen los porcentajes de inhibición obtenidos. Como se aprecia los mayores valores (entre 78 y 95 %) son observados en el grupo que recibió la FRY. Los grupos tratados tanto con el crudo de sapogeninas como con la diosgenina también presentaron valores mayores al control indometacina.

El análisis de los datos de porcentaje de inhibición indica que la FRY y la diosgenina desde la primera hora de medición presentan efecto antiinflamatorio en sus

respectivos grupos. El crudo de sapogeninas también tuvo efecto antiinflamatorio e incluso mayor que el de la indometacina. El control positivo tiene mayor efecto antiinflamatorio a partir de las 4 h post carragenina.

Los resultados analizados en este estudio permiten clasificar, según Gonzales *et al.* (2007) como elevada la actividad antiinflamatoria de la FRY (% de Inhibición > 61). La diosgenina, utilizada aunque presentó efecto antiinflamatorio y este es superior a la indometacina, no fue más potente que el de la FRY y su actividad se clasifica como elevada a las 2 h post inducción, el resto del estudio fue buena. El efecto antiinflamatorio de la diosgenina, aislada de *Tinospora malabarica* Miers, fue comprobada por Punitha *et al.* (2013) en modelo de inducción de edema por carragenina en ratas. El grupo al que se le administró diosgenina a 100mg/kg, pasadas las 3h, tuvo un porcentaje de inhibición de la inflamación de 82.01, valor mayor que el obtenido en este estudio. Esta diferencia pudiera estar relacionada con la menor dosis de diosgenina (20 mg/kg) probada en el presente estudio, que representa la quinta parte de la dosis administrada por Punitha *et al.*

En tanto el crudo de sapogeninas también presenta una elevada actividad antiinflamatoria entre las 2 y 4 h, aunque en la primera y última hora se clasifica su actividad como buena ($46 < \% \text{ de Inhibición} < 60$). La indometacina presenta su máxima actividad a las 4 h, inhibiendo la ciclooxigenasa e impidiendo la síntesis de prostaglandinas (Serhan y Godson, 2011), clasificándose su actividad en este tiempo, como buena. El efecto de la indometacina como control positivo en este modelo de inflamación fue comprobado por Romay *et al.* (1998).

La respuesta inflamatoria inducida por carragenina, mucopolisacárido sulfatado extraído del alga *Chondrus crispus*, se caracteriza por varias fases (Rosa, 1972). Una muy precoz relacionada con el trauma de la inyección. Seguidamente aparece una respuesta bifásica. La primera fase se corresponde con la primera hora y se caracteriza por la liberación de aminas vasoactivas como la histamina y la serotonina. Aproximadamente a las 2 h se liberan citoquinas. Seguidamente aparece la llamada fase tardía que se extiende hasta las 6 h y se caracteriza por la liberación de prostaglandinas como mediadores principales (Sugishita *et al.*, 1981, Burch y De, 1990, Dejidmaa *et al.*, 2018). Estos aspectos permiten evaluar los posibles mecanismos de acción de un agente antiinflamatorio en estudio. Aunque otros modelos experimentales serían necesarios para corroborar la hipótesis.

Los compuestos de interés son agliconas de saponinas esteroidales. Los principales mecanismos de acción propuestos para este tipo de metabolitos incluyen la actividad corticomimética directa e indirecta como los ginsenosidos y saikosaponinas, la inhibición de la degradación de glucocorticoides como la glycyrrhizina, y la inhibición de la formación enzimática y liberación de mediadores de la inflamación, entre los que también se encuentran algunos ginsenosidos y saikosaponinas (Mohammed *et al.*, 2014).

La potente acción antiinflamatoria observada *in vivo* con FRY desde la primera hora de inducción del edema con la γ carragenina, permite suponer que esta sustancia pudiera inhibir la vía de señalización para la síntesis de mediadores de la inflamación como la histamina y serotonina o contrarreste el incremento de la permeabilidad vascular. Estudios previos han demostrado que saponinas esteroideas aisladas de *Agave attenuata* Salm-Dyck y *Agave shrevei* Gentry han inhibido el incremento de la permeabilidad capilar (Pereira y Paz, 2005, da Silva y Parente, 2007). Lande *et al.* (2015) aislaron una saponina de *Chlorophytum borivillianum* Santapau & R.R. Fern. que tuvo efecto antiinflamatorio, reduciendo el edema plantar en roedores inducido por carragenina, inhibiendo mediadores como histamina y prostanglandinas. Además, la diosgenina evaluada como antiinflamatoria se ha demostrado que inhibe factores de transcripción como lipoporisacárido/interferón γ (IFN- γ) y AP-1 (factor de transcripción), y también bloquea la activación de la citoquina-2 y la fosforilación de JNK (quinasa c-Jun NH₂-terminal) (Hye *et al.*, 2010).

La actividad antiinflamatoria también es notable en la segunda fase, lo cual apoya el criterio que este tipo de metabolito inhibe la síntesis del ácido araquidónico (AA). Esta vía responde a su acción corticomimética. Al igual que los glucocorticoides, las sapogeninas pudieran producir un bloqueo en la síntesis de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) y eicosonoides inflamatorios (Schleimer *et al.*, 1990). Saponinas aisladas de las raíces de *Platycodon grandiflorum* redujeron los niveles de TNF- α y prostaglandinas E₂ (PGE₂) en un modelo agudo de inducción de inflamación por carragenina (Young *et al.*, 2006). El extracto metanólico de *Trigonella foenum-graecum* L inhibió la producción de phorbol-12-myristate-13-acetate- que induce citoquinas inflamatorias como TNF- α y se identificaron saponinas esteroideas que suprimieron fuertemente la producción de citoquinas, en células THP-1 (Kawabata *et al.*, 2001).

Otros metabolitos secundarios como los flavonoides, presentes en otras especies, también intervienen en procesos inflamatorios. Estudios afirman que estos compuestos tienen un comportamiento dual al inhibir la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄), afectan el metabolismo del ácido araquidónico e inhiben la síntesis de interleuquina 1 (IL-1) y como consecuencia la interleuquina 6 (IL-6), lo cual a su vez afecta la síntesis de la proteína C reactiva (PCR)

Con lo expuesto anteriormente, se puede plantear como hipótesis que esta sapogenina que se encuentra en más de un 80 % en *A. brittoniana* (Alemán y Roque, 1973) pudiera tener un mecanismo de acción que actúe a nivel primario en la señalización de la inflamación, puede prevenir tanto la liberación de los primeros mensajeros como de la cascada del AA.

Estos resultados corrobora lo predicho por el modelo *in silico*. La yucagenina, identificada como una de las sapogeninas con efecto antiinflamatorio se encuentra en concentraciones relativamente altas en los dos productos de la especie (FRY y las sapogeninas), sin embargo la diosgenina se encuentra solo en trazas en *A. brittoniana* (Alemán y Roque, 1973); por tanto la mayor contribución al efecto antiinflamatorio que

se ha publicado de esta especie comparado con otros estudios como Fundora (2016) y (Martín, 2016), pudiera ser el de la yucagenina.

Conclusiones

Conclusiones

1. Mediante los métodos *in silico* se predijo la actividad antiinflamatoria de la yucagenina y clorogenina.
2. La fracción rica en yucagenina presentó actividad antiinflamatoria elevada, valor superior al de la indometacina en modelo agudo de inflamación inducido por carragenina.

Recomendaciones

Recomendaciones

1. Evaluar experimentalmente la actividad antiinflamatoria de la clorogenina para corroborar las predicciones del modelo.
2. Evaluar actividad antiinflamatoria de ambas sapogeninas en modelos crónicos de inflamación.

*Referencias
Bibliográficas*

Referencias Bibliográficas

- (2018) *Tropicos.org*. [En línea] Disponible desde: <http://www.tropicos.org/Name/100142294>. [Consultado].
- Agrawal, P. K., Jain, D. C., Gupta, R. K. y Thakur, R. S. (1985) Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry*. 24: 2479-2496.
- Alemán, E. y Roque, E. (1973) Sapogeninas esteroidales en plantas cubanas de la familia *Agavaceae*. *Revista Cubana de Farmacia*. 7: 33-40.
- Alvarez, A. (1996) Los agaves de Cuba central. *Fontqueria*. 44: 117-128.
- Amador, V., Del Carmen, M., Morón, F., Morejón, Z., Martínez, M. J. y López, M. (2006) Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 11.
- Antre, R. V., Oswal, R. J., Kshirsagar, S. S., Kore, P. P. y Mutha, M. M. (2012) 2D-QSAR Studies of Substituted Pyrazolone Derivatives as Anti-Inflammation Agents. *Med chem*. 2: 126-130.
- Arauco, K. A. (2016) *Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de Muehlenbeckia volcánica (Benth) endlincher (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas* Universidad nacional mayor de San Marcos pp.
- Azuaje, F. (2006) Witten ih, frank e: Data mining: Practical machine learning tools and techniques 2nd edition. BioMed Central.
- Barigye, J., Freitas, P., Ausina, P., Zancan, P., Sola, M. y Castillo, J. A. (2018) Discrete fourier transform-based multivariate image analysis: Application to modeling of aromatase inhibitory activity. *ACS Combinatorial Science*. 20: 75-81.
- Betés, M. y al., e. (2008) *Farmacología para fisioterapeutas*. 1° Edición. Madrid, España, pp. 130-131 pp.
- Brereton, R. G. (2004) *Data Analysis for the Laboratory and Chemical* Chichester (UK): John Wiley & Sons Ltd.
- Brito, Y. (2011) *Predicción del mecanismo de acción tóxica de derivados fenólicos frente a T. pyriformis para realizar evaluación del riesgo ambiental*. Universidad Central "Marta Abreu" De Las Villas. Thesis pp.
- Brito, Y., Castillo, J. A., Le, H., González, Y., Torrens, F., Marrero, Y. y Rodríguez, J. E. (2013) Comparative study to predict toxic modes of action of phenols from molecular structures. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 24: 235-251.
- Burch, R. M. y De, C. (1990) A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 342: 189-193.
- Cardenas, J. O. (2007) *Efecto de extractos de plantas del semidesierto inductores de tolerancia del tomate (Lycopersicon esculentum mill.) a Fusarium oxysporum schlechtend. F. Sp. Lycopersici (sacc) snyder & hansen y su influencia en crecimiento*. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" pp.
- Carrillo, R. y González, J. A. (2002) Inflamación-endotelio-coagulación en sepsis. Conceptos actuales. *Cirugía y Cirujanos*. 70: 433-441.
- Castillo, J. A., del Toro, O., Vega, M. C., Rolón, M., Rojas, A., Casañola, G. M., Escario, J. A., Gómez, A., Marrero, Y., Torrens, F. y Abad, C. (2015) Bond-based bilinear indices for computational discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds through virtual screening. *European journal of medicinal chemistry*. 96: 238-244.
- Castillo, J. A., Casañola, G. M., Le, H., Pham, H. y Barigye, S. J. (2017) A simple method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using classification trees. *Medicinal chemistry*. 13: 664-669.
- Castillo, J. G. (2008) *Parametrización de la estructura química empleando formas lineales: Aplicaciones al Diseño Molecular Asistido por Ordenador*. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. DrC pp.
- Cervantes, A. (2016) Presencia de saponinas en *Agave spp.* de México. *Biología*. 1.
- Céspedes, C. L., Alarcon, J., Avila, J. G. y Nieto, A. (2010) Anti-inflammatory activity of *Aristolelia chilensis* Mol.(Stuntz) (Elaeocarpaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 9.
- Cuellar, C. A. y Diaz, A. A. (1979) Comparative study of some Agave grown in Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. 13: 87-90.

- da Silva, B. y Parente, J. P. (2007) A new bioactive steroidal saponin from *Agave brittoniana*. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 62: 1193-1198.
- da Silva, B. P., de Sousa, A. C., Silva, G. M., Mendes, T. P. y Parente, J. P. (2002) A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata* *Zeitschrift für Naturforschung C*. 57: 423-428.
- Da, W. L., Lee, E. B., Kang, S. S., Hyun, J. E. y Whang, W. K. (2002) Activity-guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 50: 900-903.
- Dejidmaa, B., Uuganbayar, B., Ch, E., Ch, C. y Munkhzul, G. (2018) The anti-inflammatory effect of gardi patch in carrageenan-induced paw edema of rats. *Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences*. 57: 50-54.
- Dunder, R. J., Quaglio, A. E., Maciel, R. P., Luiz-Ferreira, A., Almeida, A. C., Takayama, C., Faria, F. M. y Souza-Brito, A. M. (2010) Antiinflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 20: 376-381.
- Ehrman, T. M., Barlow, D. J. y Hylands, P. J. (2010) In silico search for multi-target anti-inflammatories in Chinese herbs and formulas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 2204-2218.
- Elorza, M. S., Ortiz, D. G. y Deltoro, V. (2011) La flora alóctona de la Comunidad Valenciana (España). *Botanica Complutensis*. 35: 97.
- Esteller, A. (2005) Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutrición hospitalaria*. 20: 5-17.
- Estrada, E., Uriarte, E., Montero, A., Teijeira, M., Santana, L. y De Clercq, E. (2000) A novel approach for the virtual screening and rational design of anticancer compounds. *Journal of medicinal chemistry*. 43: 1975-1985.
- Farmacéutica., P. I. d. C. y. T. S. x. Q. F. y. (1995) Manual de técnicas de investigación. Editado por CYTED.
- Fernández, E. (2014) *Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de Agave brittoniana T. en un modelo de colitis ulcerativa*. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Lic thesis pp.
- Ferrer, A. E., Coll, F., Ortiz, P., Fuentes, V., Teixeira, P., Adriano, C., Teixeira, J. S., M., T. y Aiardes, M. (2016) Aislamiento de la 16- \pm -hidroxidormantinona y del dormantinol, a partir de las hojas del *Cestrum taylori* Britt & Wills. *Revista Cubana de Química*. 28: 450-461.
- Ferrer, A. E., Ferreira, E., Tenório, F., Santana, K. y Aiardes, M. E. (2018) Aislamiento e identificación de compuestos esteroidales de los frutos del *Solanum jamaicense* Mill. *Revista Cubana de Química*. 30.
- Flores, T., Huamán, J. H. y Tomás, G. (2013) Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la *Melisa officinalis* "toronjil". *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 16: 47-51.
- Flórez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, Á. (2008) *Farmacología humana*: Elsevier Masson.
- Franco, L. A., Matiz, G. E., Calle, J., Pinzón, R. y Ospina, L. F. (2007) Antiinflammatory activity of extracts and fractions obtained from *Physalis peruviana* L. calyces. *Biomedica*. 27: 110-115.
- Frank, I. E. y Friedman, J. H. (1989) Classifications: Oldtimers and Newcomers *J. Chemom.* 3: 463-475.
- Fritz, H. y Becker, H. (1981) The suitability of carboxymethylcellulose as a vehicle in reproductive studies. *Arzneimittel-Forschung*. 31: 813-815.
- Fukuhara, K. y Kubo, I. (1991) Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*. 30: 685-687.
- Fundora, M. (2016) *Procedimientos para la extracción de saponinas con actividad antiinflamatoria a partir de hojas de Agave brittoniana Trel.* Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Lic thesis pp.
- Gabay, C., Kushner, I. y Engl, N. (1999) *Mecanismos de enfermedades: Bases, Proteínas y otros sistemas responsables de la Inflamación*. 3ra Ed. 448-454 pp.
- García, M. (2017) *Efecto del extracto acetónico de Agave angustifolia Haw en un modelo de artritis experimental, en ratón albino*. Instituto Politécnico Nacional: 59 pp.
- Gasquez, M. (2003) Acido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 14.
- Gómez, J. L. (2017) *Estudio bioquímico, genético y biotecnológico de la ruta catabólica responsable de la transformación de histamina en ácido imidazolacético en "Pseudomonas putida"* Universidad de León. Tesis Doc: 267 pp.

- Gonzales, E., Villca, T. y Loza, R. (2007) Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. Articulata*, *B. Dracunculifolia*, *B. Salicifolia*, *B. Ulcina*, *B. Latifolia*, *B. Pentlandii*, *B. Obtusifolia*, *B. Subalata*. *Revista Boliviana de Química*. 24.
- González, A. y Pérez, B. (2014) *Actividad Antihipertensiva de Péptidos obtenidos por hidrolisis y/o fermentación de alimentos—Modelización QSAR*. Universidad del Azuay. thesis pp.
- González, G. (2014) *Aislamiento y caracterización de compuestos derivados de plantas de la familia agavaceae con efecto antimicrobiano sobre helicobacter pylori*. Universidad Autónoma de Nuevo León: 138 pp.
- González, P. y Bolívar, A. (2014) *Actividad Antihipertensiva de Péptidos obtenidos por hidrolisis y/o fermentación de alimentos—Modelización QSAR*. Universidad del Azuaypp.
- Guerra, J. O., Simonet, A. M., Antonio, F., Domínguez, M. y Lima, C. N. (1999) *Elucidación estructural de saponinas esteroidales minoritarias presentes en hojas del Agave brittoniana T*. Universidad de La Habana. MSc thesis: 65 pp.
- Guerra, J. O. (2005) *Compuestos con actividad antiparasitaria del Agave brittoniana T* Universidad de Cádiz PhD thesis: 336 pp.
- Guillot, D. y Der, P. V. (2006) Claves de las especies del género *Agave l.* cultivadas como ornamentales en la Península ibérica e islas baleares. *Acta Botánica*. 50: 441-457.
- H.Witten, I. y Frank, E. (2005) *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques*. Second. Morgan Kaufmann Publishers.
- Hand, D. J. (1981) *Discrimination and Classification* Chichester (UK): Wiley.
- Hand, D. J. (1997) *Contruction and Assessments of Classification Rules* Chichester (UK): Wiley.
- Hernández, R., Lugo, E. C., Díaz, L. y Villanueva, S. (2005) Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*.
- Hye, D., Jin, H., Eun, H., Moon, Y., Wan, T., Oh, B., Hee, S. y Pyo, S. (2010) Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. *International immunopharmacology*. 10: 1047-1054.
- Inc, S. (2001) STATISTICA (data analysis software system) vs 6.0. Tulsa,OK:.
- Irish, M. y Irish, G. (2000) *Agaves, yuccas, and related plants: a gardener's guide*: Timber Press Portland.
- Kawabata, T., Yue, M., Hasegawa, T., Takano, F. y Ohta, T. (2001) Anti-inflammatory and anti-melanogenic steroidal saponin glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Planta Medica*. 77: pp. 705-710.
- Kim, O., Le, M., Trinh, H. y Nong, H. (2016) In silico studies for the interaction of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) with different saponins from *Vietnamese ginseng (Panax vietnamsis)*. *Biophysics and Physicobiology*. 13: 173–180 pp.
- Kumar, D., Srivastava, A., Khan, F., Chattopadhyay, S., Meena, A. y Yadav, D. (2011) In Silico exploration of anti-inflammatory activity of natural coumarinolignoids. *Chemical biology & drug design*. 78: 567–579.
- Lanas, A. (2001) Efectos secundarios gastrointestinales por antiinflamatorios no esteroideos y costes en el Sistema Nacional de Salud. In: *Anales de Medicina Interna*. SciELO Espana, pp. 9-11.
- Lande, A. A., Ambavade, S. D., Swami, U., S., Adkar, P. P., Ambavade, P. D. y Waghmare, A. B. (2015) Saponins isolated from roots of *Chlorophytum borivilianum* reduce acute and chronic inflammation and histone deacetylase. *Journal of integrative medicine*. 13: 25-33.
- Lichtman, A. H. y Abbas, A. K. (2008) *Inmunología Celular y Molecular* Habana, Cuba.
- Lipnick, R. L. (1991) Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *Science of the total environment*. 109: 131-153.
- Louis, J. C. (2003) Predicting carcinogenicity early: the latest in silico solution. *Biosilico*. 1: 115-116.
- Marinovic, M. A. (2008) Inflamación, daño y reparación en enfermedades reumáticas. *Medwave*. 8.
- Marker, R. E., Wagner, R. B., Ulshafer, P. R., Wittbecker, E. L., Goldsmith, D. y Ruof, C. H. (1943) Sterols. CLVII. Sapogenins. LXIX. 1 Isolation and Structures of Thirteen New Steroidal Sapogenins. New Sources for Known Sapogenins. *Journal of the American Chemical Society*. 65: 1199-1209.
- Marrero, Y. y Romero, V. (2002) TOMOCOMD software. TOMOCOMD (Topological Molecular Computer Design) for Windows. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

- Marrero, Y., Meneses, A., Castillo, J. A., Machado, Y., Escario, J. A., Barrio, A. G., Pereira, D. M., Nogal, J. J., Aran, V. J., Martínez, A. R., Torrens, F., Rotondo, R., Ibarra, F. y Alvarado, Y. J. (2006) Predicting antitrichomonal activity: a computational screening using atom-based bilinear indices and experimental proofs. *Bioorganisms Medicine Chemical*. 14: 6502-6524.
- Martín, D. (2016) *Evaluación en modelos experimentales del efecto antiinflamatorio de extractos de Agave brittoniana Trel subespecie brachypus*. Universidad "Marta Abreu" de Las Villas. Lic thesis: 59 pp.
- Mauler, M., Bode, C. y Duerschmied, D. (2016) Platelet serotonin modulates immune functions. *Hamostaseologie*. 36: 11-16.
- Medina, J. L., López, F. y Castillo, R. (2006) Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química* 17: 452-457.
- Mitchell, T. M. (1997) *Machine Learning*.
- Mohammed, M. S., Osman, J. A., Garelnabi, A. E., Osman, Z., Osman, B., Khalid, S. y Mohamed, M., A (2014) Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *Journal Phyto. Pharmacy* 3: 275-285.
- Monterrosas, N., Arenas, M. L., Jiménez, E., Jiménez, A. R., Zamilpa, A., Gonzalez, M., Tortoriello, J. y Herrera, M. (2013) Anti-Inflammatory Activity of Different Agave Plants and the Compound Cantalasanonin-1. *Molecules*. 18: 8136-8146.
- Morales, A., Cabrera, M. A., Pérez, M., Molina, R. y González, H. (2005) A topological substructural approach applied to the computational prediction of rodent carcinogenicity. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 13: 2477-2488.
- Mota, D., Ponce, Y., Pons, R. M. y de Witte, P. (2015) *Nueva estrategia de tamizaje farmacológico para el descubrimiento de potenciales fármacos antiinflamatorios integrando modelos in silico e in vivo*. Editorial Universitariapp.
- Neal, M. J. (2009) *Farmacología médica en esquemas* Londres.
- Núñez, W. J., Quispe, R., Ramos, N. J., Castro, A. J. y Gordillo, G. (2016) Actividad antioxidante y antienzimática in vitro y antiinflamatoria in vivo del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* "tara". *Ciencia e Investigación*. 19: 35-42.
- Ortega, A. M. y Theilkuhl, J. F. (1969) Algunos aspectos de los generos Agave y Fourcrea como causantes de enfermedades ocupacionales. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 1: 73-104.
- Parslow, T., Stites, D., Abba, T. y Imboden, J. (2001) *Medical Immunology* McGraw Hill Professional.
- Peana, A. T., Moretti, M. D., Manconi, V., Desole, G. y Pippia, P. (1997) Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponin of *Agave americana*. *Planta medica*. 63: 199-202.
- Pereira, B. y Paz, J. (2005) A new bioactive steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 60: 57-62.
- Pérez, A. A., López Mantecón, A. M. y Grau, I. (2002) Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*. 39: 119-138.
- Pérez, M., González, H., Cabrera, M. A. y Molina, R. (2004) A novel approach to predict a toxicological property of aromatic compounds in the *Tetrahymena pyriformis*. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 12: 735-744.
- Peréz, Y. (2008) *Predicción de toxicidad acuática de compuestos orgánicos sobre Pimephales promelas*. Universidad Central "Marta Abreu" De Las Villas: 80 pp.
- Punitha, D., Udhayasankar, M. R., Danya, U., Arumugasamy, K. y Shalimol, A. (2013) Anti-inflammatory activity of characterized compound diosgenin isolated from *Tinospora malabarica* Miers in Ann.(*Menispermaceae*) in animal model. *International Journal of Herbal Medicine*. 1: 76-78.
- Quinlan, J. R. (1986) Induction of decision trees. *Machine Learning*. 1: 81-106.
- Reutemann, P., Pfahringer, B. y Frank, E. (2004) A toolbox for learning from relational data with propositional and multi-instance learners. In: *Australasian Joint Conference on Artificial Intelligence*. Springer, pp. 1017-1023.
- Reyna, E., Mejía, J., Reyna, N., Torres, D., Peña, D., Colmenares, M. y Santos, J. (2008) Efecto de diosgenina sobre la proteína C reactiva y homocisteína en pacientes menopáusicos. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*. 35: 120-125.
- Rivero, M. (2016) *Efectos de Agave brittoniana en parámetros bioquímicos y antropométricos en modelo experimental de Síndrome Metabólico*. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clarapp.

- Robbins, S., Cotran, R. S. y Kumar, V. (2015) *Patología estructural y funcional* 9a Ed. Chicago, Illinois.
- Romay, C., Ledon, N. y Gonzalez, R. (1998) Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflammation Research*. 47: 334-338.
- Rosa, M. (1972) Biological properties of carrageenan. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 24: 89-102.
- Schleimer, R. P., Claman, H. N., Oronsky, A. y Goodwin, J. S. (1990) Antiinflammatory steroid action: Basic and clinical aspects. Nueva York, Estados Unidos: Wiley Online Library.
- Serhan, C. N. y Godson, C. (2011) Endogenous Anti-inflammatory and Proresolving Lipid Mediators in Renal Disease. *Regenerative Nephrology*. pp. 69-92: Elsevier.
- Setty, A. R. y Sigal, L. H. (2005) Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier, pp. 773-784.
- Silva, J. B., Ramos, M. N., Barros, B., Melo, S. J., Falcão, E. P. y Catanho, M. T. (2008) Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2, 6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 19: 337-343.
- Sirtori, C. R. (2001) Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*. 44: 183-193.
- Siverio, D., Vicet, L., Rivero, Y., Sueiro, M. L., Marrero, Y. y Arán, V. J. (2012) Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de nuevas 5-nitroindazolinonas Villa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu".
- StatSoft, I. (2001) STATISTICA (data analysis software system), version 6. In: *Tulsa, USA*.
- Sueiro, M. L. (2011) Farmacología experimental. Santa Clara, Cuba.
- Sugishita, E., Amagaya, S. y Ogihara, Y. (1981) Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacobio-dynamics*. 4: 565-575.
- Sur, P., Chaudhuri, T., Vedasiromoni, J. R., Gomes, A. y Ganguly, D. K. (2001) Antiinflammatory and antioxidant property of saponins of tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] root extract. *Phytotherapy research*. 15: 174-176.
- Szekanecz, Z., Szucs, G., Szántó, S. y Koch, A. E. (2006) Chemokines in rheumatic diseases. *Current drug targets*. 7: 91-102.
- Tapondjou, L. A., Ponou, K. B., Teponno, R. B., Mbiantcha, M., Djoukeng, J. D., Nguelfack, T. B., Watcho, P., Cadenas, A. G. y Park, H. J. (2008) In vivo anti-inflammatory effect of a new steroidal saponin, mannioside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*. *Archives of pharmacal research*. 31: 653.
- Todeschini, R. y Consonni, V. (2008) *Handbook of molecular descriptors*: John Wiley & Sons.
- Vandeginste, B. G., Massart, D. L., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P. J. y Smeyers-Verbeke, J. (1998) **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part B**
- Amsterdam (The Netherland): Elsevier.
- Vicet, M. L. (2009) *Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L.* Instituto Superior de Ciencias Médicas "Victoria de Girón" y Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Sierra, G.: 85 pp pp.
- Villalba, E. (2014) Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 43.
- Vizcaino, D. (2017) *Evaluación del efecto hipolipémico de *Agave brittoniana* Trel en modelo agudo experimental de hiperlipidemia*. Universidad central "Marta Aabreu" de las Villas: 52 pp.
- Wang, J. H., Redmond, H. P., Watson, R. W., Condrón, C. y Bouchier, D. (1995) Induction of heat shock protein 72 prevents neutrophil-mediated human endothelial cell necrosis. *Archives of surgery*. 130: 1260-1265.
- Wei, F., Ma, L.-Y., Jin, W.-T., Ma, S.-C., Han, G.-Z., Khan, I. A. y Lin, R.-C. (2004) Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 52: 1246-1248.
- Winter, C. A., Risley, E. A. y Nuss, G. W. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 111: 544-547.
- Winyard, P. G. y Willoughby, D. A. (2003) Inflammation Protocols.

- Young, J., Pil, Y., Hee, D., Hee, E., Chul, Y., Hwan, S. y Gwang, H. (2006) Inhibitory effect of the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on carrageenan-induced inflammation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70: pp. 858-864
- Yu, J., Chan, Q. y Zhu, L. (2011) Evaluation of the in vivo anti-inflammatory activity of a flavone glycoside from *Cancrinia discoidea* (Ledeb.) Poljak. *EXCLI Journal*. 10.
- Zahra, M., Osman, A., Agwa, H., Nair, N. y Sanchez, A. (2016) Synthesis, Biological Evaluation, Docking and QSAR Studies of Some Novel Naphthalimide Dithiocarbamate Analogs as Antitumor and Anti-Inflammatory Agents. *Med Chem (Los Angeles)*. 6: 694-703.