

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MODULADORA DEL ACEITE ESENCIAL
Y EL EXTRACTO SFE OBTENIDO DE LA PLANTA *Lippia origanoides*
SOBRE LA SECRECIÓN DE LA INTERLEUCINA 8 Y EL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA.**

ELIZABETH AMPARO QUINTERO RUEDA



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2015

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MODULADORA DEL ACEITE ESENCIAL
Y EL EXTRACTO SFE OBTENIDO DE LA PLANTA *Lippia origanoides*
SOBRE LA SECRECIÓN DE LA INTERLEUCINA 8 Y EL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA.**

ELIZABETH AMPARO QUINTERO RUEDA

Proyecto de grado presentado para optar por el título de:

Bióloga

Orientadora

RAQUEL E. OCAZONEZ JIMÉNEZ PhD.

Profesora Titular de la Escuela de Medicina

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

DEDICATORIA

A mis padres Luz Amparo y Carlos Alberto, mi familia muy especialmente a mi tía Celina, quienes siempre han estado junto a mí para apoyarme en todos los proyectos de mi vida.

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino”

Nikola Tesla

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la profesora Raquel E. Ocazonez por su comprensión y paciencia durante este año de aprendizaje y por darme la oportunidad de ser miembro del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Metabólicas bajo su dirección.

Agradezco a María Camila Flechas, Sindi Alejandra Velandia, María Fernanda Carreño, Cinthy Jiménez y a todo el grupo CINTROP por su paciencia, ayuda y buenos consejos.

Un agradecimiento especial a César Prada y Daniel Osorio por sus consejos, paciencia, colaboración en el proceso de aprendizaje y disponibilidad.

A mi familia por su apoyo moral, económico y por su amor.

Por último, pero no menos importantes: Jimmy Burgos, Leidy Pico, Andrea Vargas, Jhonatan Carreño, Nicolás Gómez, Diego Gómez y Profe Jorge Hernández por escucharme, aconsejarme y compartir momentos agradables, por ayudarme a mantener la perspectiva cuando los tiempos eran difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS.....	16
General	16
Específicos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Muestras de <i>Lippia origanoides</i>	17
2.2 Compuestos sintéticos	17
2.3 Cultivo celular	18
2.4 Actividad citotóxica	18
2.5 Actividad sobre citoquinas	19
2.5.1 Optimización del ensayo	19
2.5.2 Cuantificación de citoquinas	20
2.5.3 Actividad de <i>Lippia origanoides</i>	20
2.6 Análisis de datos.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 Actividad citotóxica	22
3.2 Actividad sobre citoquinas	23
3.2.1 Optimización del ensayo	23
3.2.3 Actividad de <i>Lippia origanoides</i>	27
4. DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIONES	35

6. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Actividad citotóxica de las muestras evaluadas en el estudio.....	23
Figura 2. Secreción de citoquinas por monocitos humanos (THP-1).	24
Figura 3. Moléculas de citoquina secretadas por monocitos humanos estimulados con respecto a moléculas de lipopolisacárido.....	26
Figura 4. Efecto de las muestras sobre la secreción de citoquinas por monocitos humanos no-estimulados.....	28
Figura 5. Efecto de las muestras sobre la secreción de citoquinas por monocitos humanos estimulados.	30

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones usadas en el estudio para estimular monocitos humanos	
TPH-1.	25

RESUMEN

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MODULADORA DEL ACEITE ESENCIAL Y EL EXTRACTO SFE OBTENIDO DE LA PLANTA *Lippia origanoides* SOBRE LA SECRECIÓN DE LA INTERLEUCINA Y EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA.*

AUTOR

ELIZABETH AMPARO QUINTERO RUEDA**

PALABRAS CLAVES:

Inmunomodulador, citoquinas pro-inflamatorias, Interleucina-8, Factor de necrosis tumoral α , *Lippia origanoides*, Lipopolisacárido.

DESCRIPCIÓN

Introducción- Los productos derivados de plantas son fuente de compuestos base para la industria de la medicina herbal y por lo tanto es recomendado investigar el efecto de los mismos sobre el proceso inflamatorio. *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenacea) es conocida por sus propiedades antimicrobianas, antibacterianas, analgésicas entre otras; no obstante, poco se conoce sobre el efecto en citoquinas que promueven la inflamación.

Objetivo- Evaluar el efecto de productos obtenidos de *Lippia origanoides* sobre la secreción *in vitro* de las citoquinas IL-8 y TNF- α .

Metodología- Se incluyó el aceite esencial, el extracto de la planta y β -cariofileno un metabolito del aceite esencial. Se realizaron ensayos sobre monocitos humanos THP-1 sembrados en placa. La concentración máxima no-tóxica de cada muestra se determinó por afectación de la viabilidad celular usando el ensayo de MTT. Monocitos LPS-estimulados y monocitos no-estimulados se trataron con cada muestra y se cuantificó las citoquinas en el medio de cultivo a las 4h y 8h. Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significantes.

Resultados- La estimulación de 5×10^5 células/mL con 50ng/mL por 4 horas fueron las condiciones que resultaron tener la mayor diferencia con respecto al control: IL-8: 908.7 ± 19.3 vs. 102.7 ± 62.7 pg/mL; TNF- α 511.9 ± 166.9 vs. 22 ± 31 pg/mL. El tratamiento con las muestras en monocitos no-estimulados no indujo secreción de citoquinas. En monocitos LPS-estimulados, el extracto inhibió la secreción de IL-8 (0.65 veces menos que el control; $p < 0.05$) pero no la de TNF- α (0.13 veces menos que el control, $p > 0.05$). El aceite y su metabolito no tuvieron efecto.

Conclusiones- Se implementó en el Laboratorio de Arbovirus del CINTROP un ensayo basado en célula para evaluar la actividad moduladora de aceites esenciales y extractos de una muestra biológica sobre citoquinas humanas. Se aportó evidencias que podrían atribuir la actividad del extracto de *Lippia origanoides* como fuente primaria para la fabricación de un remedio o droga anti-inflamatoria. El extracto y aceite esencial de *Lippia origanoides* no presentaron efecto alérgico bajo las condiciones usadas en el estudio.

*Pasantía de investigación

**Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Directora: Ph.D Raquel Ocazonez Jiménez

ABSTRACT

TITLE

EVALUATION OF THE MODULATING ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL AND THE SFE EXTRACT OBTAINED OF THE PLANT *Lippia origanoides* ON THE SECRETION OF THE INTERLEUKIN 8 (IL-8) AND THE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α)*

AUTHORS

ELIZABETH AMPARO QUINTERO RUEDA **

KEY WORDS:

Immunomodulatory, pro-inflammatory cytokines, Interleukin 8, Tumor necrosis factor α , *Lippia origanoides*, lipopolysaccharide.

DESCRIPTION

Introduction- Products derived from plants are a source of basic compounds for the herbal medicine industry and therefore it is recommended to investigate the effect of the same on the inflammatory process. *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae) is known due to its multiple antimicrobial, antibacterial, among other analgesic properties. However, little is known about the effect on cytokines that promote inflammation.

Objective- To evaluate the effect of products obtained from *Lippia origanoides* on *in vitro* cytokine IL-8 and TNF- α secretion.

Methodology- Essential oil and plant extract was included and β -caryophyllene a metabolite of the essential oil. Essays on human monocytes THP-1 were seeded on wells plate. The maximum non-toxic concentration of each sample was determined by affecting cell viability using the MTT assay. LPS-stimulated monocytes and non-stimulated monocytes were treated with each sample and cytokines were quantified in the culture medium at 4h and 8h. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results- The stimulation of 5×10^5 cell/mL with 50 ng/mL and 4 hours were the conditions that resulted in the largest difference from control: IL-8: 908.7 ± 19.3 vs. 102.7 ± 62.7 pg/mL; TNF- α 511.9 ± 166.9 vs. 22 ± 31 pg/mL. Treatment with the samples in non-stimulated monocytes didn't induce cytokine secretion. The extract inhibited the secretion of IL-8 (0.65 time less than control, $p < 0.05$) on LPS-stimulated monocytes, but not on TNF- α (0.13 time less than control, $p > 0.05$). Essential oil and its metabolite had no effect.

Conclusions- A cell-based assay was implemented in the Arbovirus Laboratory of CINTROP to evaluate the modulatory activity of essential oils and extracts from a biological sample of human cytokine assay. Evidence was provided that the activity could be attributed of *Lippia origanoides* extract as a primary source for the production of a remedy or anti-inflammatory drug is provided. The extract and essential oil of *Lippia origanoides* have no allergenic effect under the conditions used in the study.

*Internship of Investigation

**Science faculty. Department of Biology. Director: Ph.D. Raquel Ocazonez Jiménez.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos la medicina tradicional ha sido utilizada para el tratamiento de diferentes enfermedades basándose en el uso de sustancias de origen vegetal (Burns *et al.*, 2010). Actualmente, más de 20.000 medicamentos licenciados tienen como principio activo un producto del mismo origen (Amirghofran, 2012). El aceite esencial (AE) y el extracto (EXT) de plantas medicinales y aromáticas son ampliamente utilizados para la fabricación de productos de uso humano como cosméticos, perfumes y remedios para aliviar síntomas de enfermedades (Bakkali *et al.*, 2008). Entre las posibles propiedades bioactivas de los aceites esenciales y extractos se ha demostrado que modulan la respuesta inflamatoria y en consecuencia causan efectos favorables en usuarios de productos fabricados con ellos (Riella *et al.*, 2012; Zare-Shahneh *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2014). Por lo tanto, la evaluación de las posibles propiedades bioactivas de metabolitos de plantas, constituye una estrategia eficaz para la identificación de sustancias con potencial farmacológico.

La base patológica de una amplia variedad de enfermedades humanas es la respuesta inmune del individuo (Akdis *et al.*, 2011). Esta respuesta es más fuerte, cuando diferentes mecanismos celulares conducen a la inflamación de órganos. El proceso inflamatorio es definido como una secuencia de eventos que ocurre en respuesta a estímulos externos, traumas o invasión de patógenos (Calixto *et al.*, 2004), uno de los inmunoestimuladores mejor estudiados es el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, que es un componente estructural de la membrana externa, el cual activa la respuesta inmune inflamatoria sistémica en individuos enfermos (Beutler & Rietschel, 2003). La respuesta producida involucra diferentes tipos de células entre ellas los monocitos que hacen parte de la inmunidad innata y que cumplen su principal función fagocítica, secretando proteínas quimio-atrayentes como IL-8 y pro-inflamatorias como TNF- α (Bosch *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2014). Las citoquinas son un diverso grupo de proteínas

multifuncionales secretadas constantemente por las células (Calixto *et al.*, 2004; Oppenheim, 2001). La liberación de TNF- α en el torrente sanguíneo y en los tejidos conlleva a varios eventos del proceso inflamatorio: hinchazón debido a vasodilatación con aumento de la permeabilidad vascular; reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos); activación y adhesión de plaquetas al endotelio vascular y activación de células del sistema inmune específico (linfocitos T y B) (Mózes *et al.*, 2011). Cuando los niveles de TNF- α en sangre son muy elevados, el efecto es deletéreo llevando al choque séptico y coagulación intravascular diseminada que provoca la muerte (Anaya, 2003). Por otra parte, las interleucinas tienen un papel preponderante como la regulación del sistema inmunológico; activación de la respuesta inmune de defensa y la diferenciación celular para mantener el número normal de glóbulos blancos y hematíes (Kumar *et al.*, 2012; Tisonick *et al.*, 2012). Interleucinas como IL-8 es uno de los primeros mediadores de la respuesta inflamatoria. Las principales funciones efectoras de IL-8 no solo inducen quimiotaxis de neutrófilos al sitio de la infección o daño, sino también de otros granulocitos. Además IL-8 induce fagocitosis y es conocido por ser un potente promotor de la angiogénesis. (Zeilhofer & Schorr, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002).

En Colombia existe una amplia diversidad de plantas medicinales, que aproximadamente el 71% de la población utiliza para aliviar síntomas de distintas enfermedades (Bernal *et al.*, 2011). *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae) es una planta aromática conocida como “orégano de monte” que tradicionalmente se usa en infusiones de sus hojas y se emplea en la medicina popular para el tratamiento de dolor de estómago, indigestión, náuseas, y como antiséptico general para la boca, la garganta y heridas (Pascual *et al.*, 2001). La bioactividad de los productos de *L. origanoides* ha sido evaluada demostrando actividades antimicrobianas contra organismos patógenos (Dos Santos *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014), antibacterianas, antiparasitarias, antiespasmódicas, antiinflamatorias *in vivo*, analgésicas y antisépticas (Pascual *et al.*, 2001; Stashenko *et al.*, 2010; Oliveira *et*

al. 2014). Estudios publicados por Stashenko *et al* (2013), demostraron que uno de los componentes mayoritarios más abundantes del aceite esencial de *L. origanoides* es el β -cariofileno, que tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Legaut & Pichette, 2007). En estudios realizados por el grupo de Arbovirus del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP), se ha identificado que este componente tiene además actividad antiviral sobre el virus del Dengue y de la fiebre amarilla (Ocazonez *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2013; Flechas & Ocazonez, 2014).

Para evaluar el efecto inmuno-modulador *in vitro* de una muestra, es necesario detectar cambios en la concentración de citoquinas secretadas por la célula. Existen diferentes ensayos basados en célula los cuales varían en complejidad, tiempo para obtener el resultado y costos; esto hace que deba seleccionarse el ensayo indicado de acuerdo al propósito del estudio (Gupta *et al.*, 2007). Actualmente es una necesidad implementar en el Laboratorio de Arbovirus del CINTROP un ensayo basado en célula para los análisis de los AEs y EXTs incluidos en el Programa de Bioprospección. El propósito del presente trabajo es evaluar el potencial modulador del AE y el EXT SFE de *Lippia origanoides* que crece en Colombia, así como del componente del aceite esencial β -cariofileno sobre la secreción de IL-8 y TNF- α por monocitos humanos cultivados *in vitro*.

1. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto modulador del aceite esencial, β -cariofileno y el extracto SFE obtenidos de la planta *Lippia origanoides* crecida en Colombia, sobre la secreción de la interleucina y el factor de necrosis tumoral en células THP-1.

Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas (número de células, concentración y tiempo de exposición a Lipopolisacárido) que secretan mayor cantidad de Interleucina-8 y el Factor de Necrosis Tumoral.
2. Evaluar el potencial citotóxico del aceite esencial, β -cariofileno y extracto de *Lippia origanoides* sobre células THP-1.
3. Evaluar el efecto del aceite esencial, β -cariofileno, extracto de *Lippia origanoides* sobre la secreción de Interleucina-8 y el Factor de Necrosis Tumoral en células THP-1.
4. Evaluar el efecto inhibitorio del aceite esencial, β -cariofileno, extracto de *Lippia origanoides* sobre la secreción de Interleucina-8 y el Factor de Necrosis Tumoral mediada por Lipopolisacárido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras de *Lippia origanoides*

El aceite esencial y el extracto de la planta fueron seleccionados de la colección disponible en el CINTROP. Las muestras fueron suministradas por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) de la Universidad Industrial de Santander, miembro de la UT-BioRed-CENIVAM-Co. El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación asistida por microondas -MWH- y el extracto por el procedimiento con fluido supercrítico -SFE- (Stashenko *et al.*, 2013). Para este estudio, se utilizaron alícuotas del aceite esencial y el extracto a una concentración inicial de 100.000 µg/mL disueltas en dimetil sulfoxido (máxima concentración en uso 1%) que se distribuyó y almacenó en alícuotas a -20°C. Para cada experimento se usó una alícuota nueva de la misma preparación y se hicieron diluciones en medio de cultivo RMPI – 1640.

2.2 Compuestos sintéticos

β-Cariofileno: conocido como un componente de aceite esencial (Stashenko *et al.*, 2013). Se adquirió comercialmente (SIGMA-ALDRICH Co.) y se preparó una solución inicial a concentración de 100.000 µM diluido en dimetil sulfoxido (máxima concentración en uso 1%) que se distribuyó y almacenó en alícuotas a -20°C. Para los experimentos se hicieron diluciones en medio de cultivo RMPI - 1640.

Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS O55:B5): denominado inductor de citoquinas pro-inflamatorias. Se adquirió comercialmente (SIGMA-ALDRICH Co.) Se preparó una solución inicial en buffer fosfato salino (PBS) a concentración de 1 mg/mL la cual se distribuyó y almacenó en alícuotas a -20°C. Para los experimentos se hicieron diluciones en medio de cultivo RMP- 1640.

Dexametasona: Glucocorticoide conocido por su actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora (Tsurufuji *et al.*, 1979) se incluyó como compuesto control de actividad inhibitoria. Se adquirió comercialmente (SIGMA-ALDRICH Co.) Se preparó una solución inicial en dimetil sulfoxido a 100.000 μM , la cual se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -20°C . Para los experimentos se hicieron diluciones en medio de cultivo RMPI - 1640.

2.3 Cultivo celular

Se empleó la línea celular de monocitos humanos (línea THP-1; ATCC® TIB-202™) Las células fueron crecidas y mantenidas en cajas de 75cm^2 a 37°C con atmósfera de 5% de CO_2 en medio RMPI-1640 (RPMI-1640 GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de Bicarbonato de sodio, 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, GIBCO) y 0.05mM de 2-mercaptoetanol (MERCK). El seguimiento del cultivo celular fue realizado con microscopio invertido (Olympus CKX41/31).

2.4 Actividad citotóxica

La toxicidad de las muestras seleccionadas para los monocitos humanos se evaluó usando el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), siguiendo el protocolo del laboratorio ya descrito (Gómez *et al.*, 2013) con modificaciones. Este ensayo se basa en la reducción del MTT por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas. En la reacción la succinato-deshidrogenasa transforma al MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto azul, hidrofóbico (formazán) y por lo tanto la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Monocitos humanos fueron sembrados en placas de 96 pozos por 24 h a 37°C en presencia de aceite esencial, extracto SFE o β -cariofileno. Al término, una solución de MTT (20 μL , 5 mg/mL. Sigma Co.) se añadió a cada pozo por 4 h a 37°C . Posteriormente, el precipitado formado que contenía cristales de formazán

fue solubilizado en 100 μ L de DMSO. El grado de reducción de MTT a formazán se cuantificó midiendo la densidad óptica a 580 nm (DO_{580}) en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific). Cada muestra se evaluó por triplicado en dos ensayos independientes. La toxicidad se expresó como: concentración máxima evaluada no tóxica (CMNT) - concentración máxima de la muestra que mantuvo la viabilidad similar al control celular y concentración citotóxica 50 (CC_{50}) – concentración que redujo en 50% la viabilidad celular comparada con el control.

2.5 Actividad sobre citoquinas

2.5.1 Optimización del ensayo

Los primeros ensayos se realizaron para establecer las condiciones experimentales con las cuales se detectó la mayor cantidad de IL-8 y TNF- α secretada cuando los monocitos humanos fueron cultivados en presencia o ausencia del inductor LPS. Los experimentos se realizaron variando el número de células por pozo, la concentración y el tiempo de exposición al LPS. Monocitos humanos fueron sembrados en placa de 24 pozos a 5×10^5 - 15×10^5 células/mL, (500 μ L/pozo) y en cada caso fueron estimulados con LPS a concentración de 12.5 ng/mL o 50.0 ng/mL, durante 4 horas y 8 horas a 37°C. Al término los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -70°C para la cuantificación de citoquinas. Se consideró la secreción de citoquinas como la cantidad de IL-8 y TNF- α detectada en el cultivo sobre el número de células en el mismo y las condiciones de exposición como el número de moléculas de LPS sobre el número de células en el cultivo. Se calculó el número de moléculas de LPS de las dos concentraciones evaluadas, así como el número de moléculas de IL-8 y TNF- α teniendo en cuenta el peso molecular de cada citoquina, del LPS y se multiplico por el número de Avogadro; estos valores se dividieron en el número de células sembradas en total.

2.5.2 Cuantificación de citoquinas

La concentración de IL-8 y TNF- α (pg/mL) en el sobrenadante del cultivo de los monocitos humanos estimulados con LPS se determinó usando estuches comerciales del inmunoensayo ligado a enzima [ELISA: Invitrogen KHC0081 y KHC3011, respectivamente]. El ensayo consistió en: Un volumen de la muestra fue adicionado a los pozos sensibilizados con el anticuerpo monoclonal específico para cada citoquina, la placa fue incubada a temperatura ambiente de 1-2 horas, posteriormente se realizaron lavados con buffer, a continuación se agregó el anticuerpo secundario monoclonal biotilado, después de una segunda incubación y lavado, se añadió el conjugado estreptovidina-peroxidasa y se incubó durante 30 minutos, se realizó un tercer lavado y finalmente añadió el cromógeno estabilizado tetrametilbenzindina (TMB) que actuó sobre la enzima unida y convirtió el sustrato en un compuesto coloreado (amarillo). La intensidad de este producto coloreado fue directamente proporcional a la concentración de citoquina presente en la muestra original. La intensidad de color se midió en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) a longitud de onda de 450 nm (DO_{450}). La concentración de la citoquina se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante, usando la curva de calibración de cada estuche comercial.

2.5.3 Actividad de *Lippia origanoides*

Monocitos humanos fueron sembrados en placa de 24 pozos en presencia de las muestras a la máxima concentración no-toxica para la célula que se determinó en el ensayo del MTT con las condiciones establecidas en el ensayo de optimización. Se realizaron dos experimentos: i) tratamiento en monocitos no-estimulados con LPS para evaluar el efecto inductor de las muestras; y ii) tratamiento de monocitos estimulados con LPS para determinar el efecto inhibitorio sobre la secreción de las citoquinas. Al término los sobrenadantes fueron colectados después del tratamiento y almacenados a -70°C para la cuantificación de citoquinas como se describió. Células no-tratadas y tratadas con dexametasona se usaron como controles. Cada

muestra se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes. El efecto modulador se expresó como incremento o disminución de la citoquina en comparación a las células no tratadas.

2.6 Análisis de datos

Las comparaciones estadísticas entre los tratamientos se realizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) factorial realizado en el programa estadístico STATISTICA V.7 (versión 7.0, para Windows, StatSoft Inc. (2004)).

La dependencia dosis ~ efecto se evaluó mediante Análisis de Varianza (ANOVA), el ajuste de una curva logística a los datos de sobrevivencia observados en los ensayos de MTT, se determinó aplicando una prueba de Wald. La concentración citotóxica media (CC₅₀) fue calculada. Para el análisis de datos se usaron los paquetes estadísticos del software libre R (R Core Team, 2013). Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significantes.

El cambio en los niveles de secreción de las dos citoquinas fue definido como la razón $IL-8 \text{ ó } TNF-\alpha_{\text{tratamiento}} / IL-8 \text{ ó } TNF-\alpha_{\text{control}}$. Para evaluar la dependencia de la secreción de IL-8 y TNF- α al tratamiento con el AE, β -cariofileno o EXT se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) aplicando una prueba de Tukey. La inhibición de la secreción de IL-8 y TNF- α en células estimuladas por LPS fue evaluada de la misma forma. Para representar gráficamente la modulación e inhibición se realizó un gráfico de $-\log_{10} p \text{ (tukey)} \sim \log_{10} (IL-8 \text{ ó } TNF-\alpha_{\text{tratamiento}} / IL-8 \text{ ó } TNF-\alpha_{\text{control}})$.

3. RESULTADOS

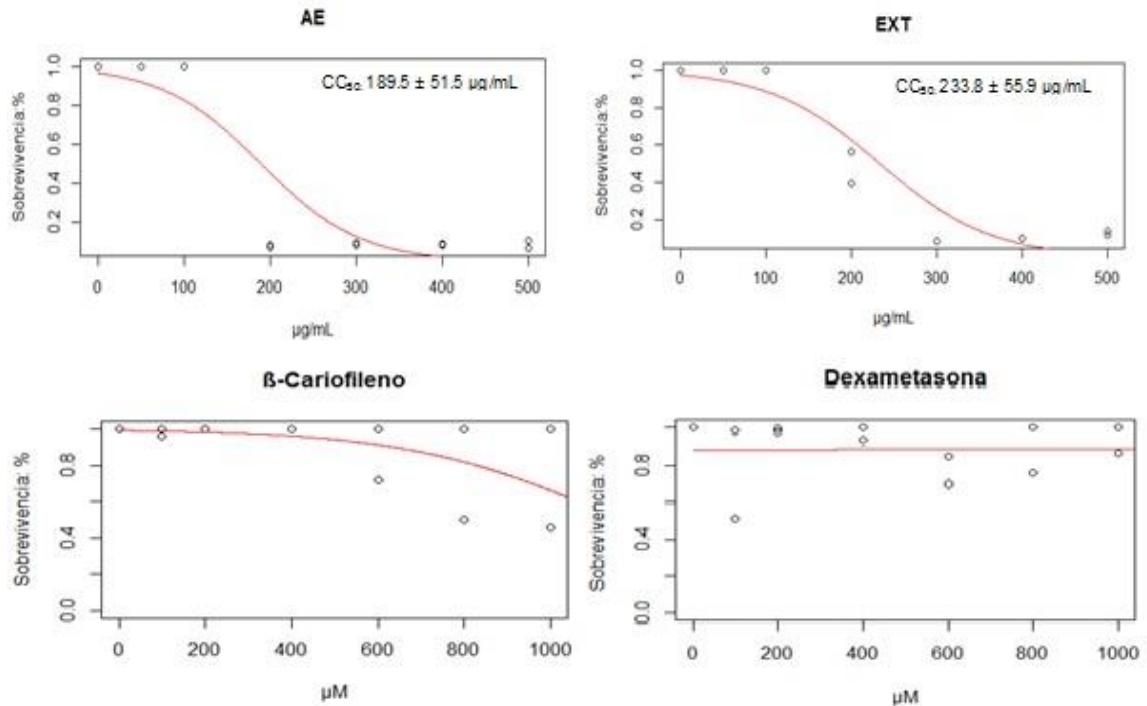
3.1 Actividad citotóxica

La toxicidad sobre los monocitos humanos de las muestras seleccionadas (aceite esencial, β -cariofileno, extracto SFE y dexametasona) fueron evaluadas para establecer la CMNT a usar en el ensayo de modulación de las citoquinas. La Figura 1 muestra las curvas dosis-respuesta del ensayo de MTT. Las muestras analizadas en este estudio se pueden considerar no-toxicas para los monocitos humanos utilizados debido a que el tratamiento no modificó la sobrevivencia celular ni se observaron cambios morfológicos en las concentraciones evaluadas.

El aceite esencial y extracto SFE afectaron la sobrevivencia celular de manera dependiente de la dosis. La CMNT para estas dos muestras fue 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CC_{50} de $189.5 \pm 51.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $233.8 \pm 55.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ para el aceite esencial y extracto SFE respectivamente. El β -cariofileno y dexametasona fueron evaluados desde 100 - 1000 μM y parecen ser de baja toxicidad ($\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$) debido a que la respuesta no fue dependiente de las dosis evaluadas. Sin embargo, se usó la CMNT de 100 μM para el ensayo de modulación de citoquinas.

Figura 1. Actividad citotóxica de las muestras evaluadas en el estudio.

Las células se expusieron a las concentraciones de las muestras evaluadas y la viabilidad se evaluó a las 24 h usando el ensayo del MTT. CC₅₀: concentración que redujo en 50% la viabilidad.



3.2 Actividad sobre citoquinas

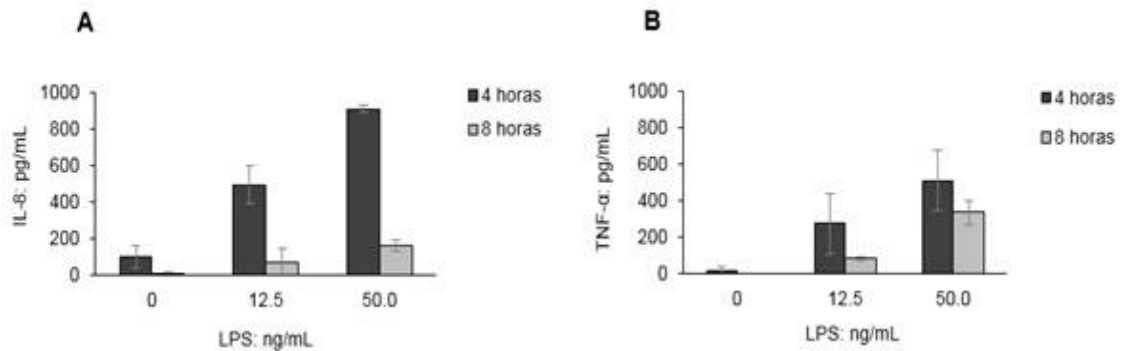
3.2.1 Optimización del ensayo

Los experimentos llevados a cabo permitieron establecer las condiciones en las cuales monocitos humanos estimulados con LPS, secretaron IL-8 y TNF- α en mayor cantidad respecto al control celular (no tratados con LPS). La exposición de 10×10^5 células/mL a 12.5 ng/mL y 50.0 ng/mL de LPS durante 4 y 8 horas mostró una acumulación significativa ($p \leq 0.05$) de IL-8 y TNF- α en el sobrenadante celular transcurridas las 4 horas de exposición respecto a las 8 horas (Figura 2). Cuando los monocitos se estimularon con 12.5 ng/mL de LPS la concentración de IL-8 en el sobrenadante fue 6.6 veces más que a las 8 horas (495 ± 102.8 pg/mL vs. $74.9 \pm$

60.3 pg/mL). Por otra parte, cuando los monocitos se estimularon con 50.0 ng/mL de LPS, la secreción de IL-8 incrementó 5.5 veces y continuó siendo mayor a las 4 horas (908.7 ±19.3 pg/mL vs. 163.9 ± 30.7 pg/mL). Resultados similares se obtuvieron para TNF- α , cuando los monocitos se estimularon con 12.5 ng/mL de LPS la secreción fue 3.2 veces más a las 4 horas que a las 8 horas. De la misma manera, con 50.0 ng/mL de LPS se presentó mayor secreción de TNF- α a las 4 horas que a las 8 horas (511.9 ± 166.9 pg/mL vs. 337.3 ± 64.4 pg/mL). Estos resultados indican que la estimulación de monocitos humanos con 50.0 ng/mL de LPS resultó en un patrón comparable entre IL-8 y TNF- α con un aumento a las 4 horas y un subsecuente decrecimiento a las 8 horas de estimulación.

Figura 2. Secreción de citoquinas por monocitos humanos (THP-1).

El nivel de IL-8 (A) y TNF- α (B) se cuantifico 4 h y 8 h después de incubar las células a 37°C. Cultivos en medio sin LPS (no-estimulados) se incluyeron como control.



Para evaluar el efecto del número de células en la secreción de citoquinas, se realizaron ensayos con mayor y menor número de células (5×10^5 células/mL a 15×10^5 células/mL) a las utilizadas en el primer ensayo. Para determinar si las diferencias en la concentración de las dos citoquinas en los cultivos con diferente número de células eran debidas a un aumento en la activación y secreción de IL-8

y TNF- α y no a la diferencia en el número de células, se consideraron las condiciones de exposición en relación a la cantidad media de LPS por célula en el cultivo y el nivel de activación y secreción en relación a la cantidad media de IL-8 y TNF- α secretada por célula en el cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones usadas en el estudio para estimular monocitos humanos TPH-1.

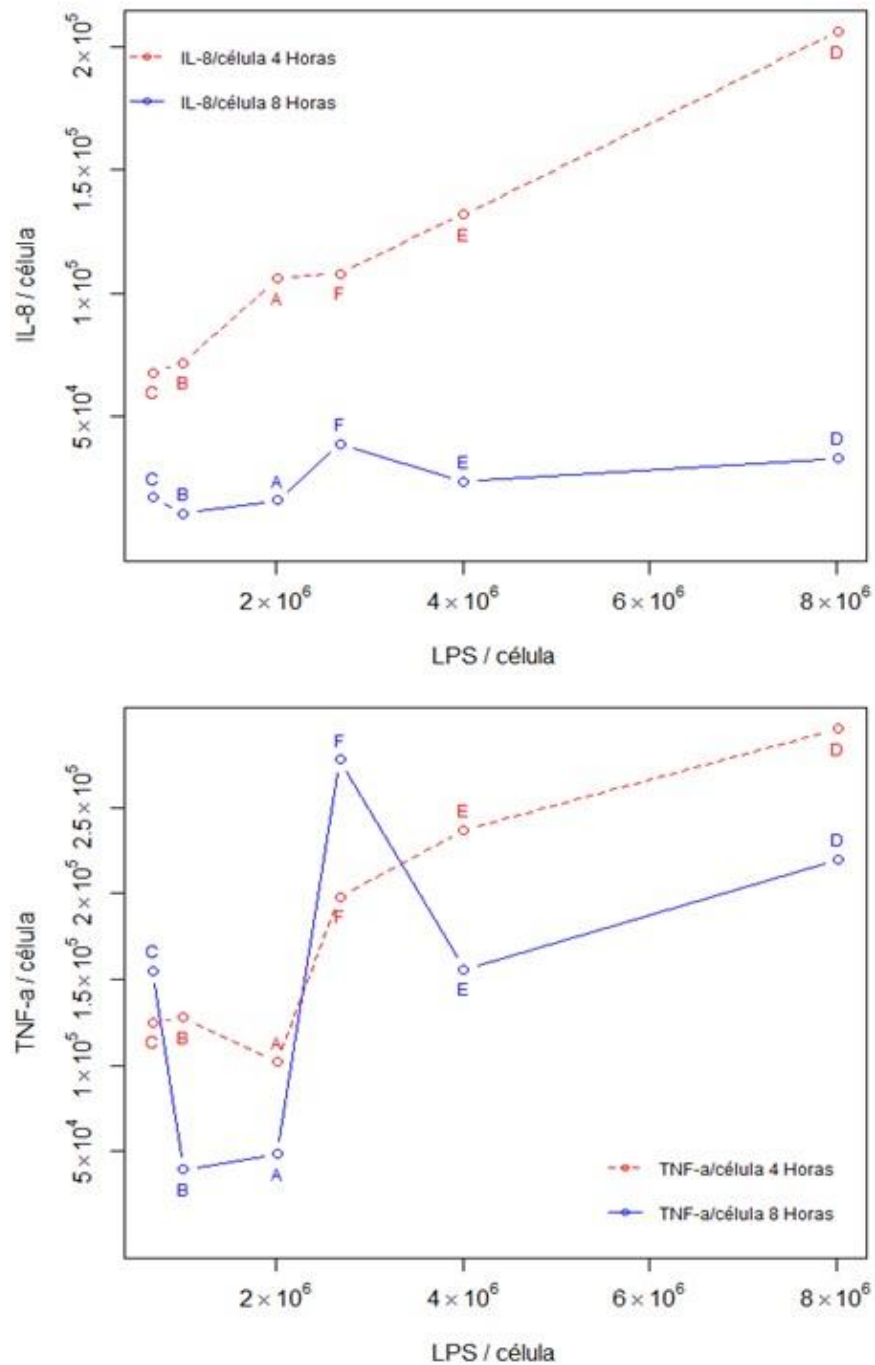
Identificador	Células: x10 ⁵	Estímulo: LPS*	
		ng/mL	Moléculas: x10 ⁶
A	5	12.5	2.01
B	10	12.5	1.00
C	15	12.5	6.69
D	5	50.0	8.03
E	10	50.0	4.01
F	15	50.0	2.68

LPS = lipopolisacárido bacteriano. Se muestra la concentración (ng/mL) de LPS para el número de células sembradas en el pozo de la placa. El número de moléculas se calculó como se describe en el texto.

La secreción de IL-8 y TNF- α en monocitos humanos fue dependiente de las condiciones de exposición (Figura 3). Se observó que la secreción de IL-8 en el cultivo fue mayor a las 4 horas de estimulación en cualquier condición del ensayo; la condición D (5x10⁵ células/mL con 50.0 ng/mL) se estimó como la concentración en la cual se secretó en mayor cantidad IL-8, mientras condiciones como C y F presentaron menor secreción de la citoquina a pesar de ser las condiciones que tenían mayor número de células. De la misma forma, la secreción de TNF- α fue mayor a las 4 horas de estimulación que a las 8 horas. También se observó que la condición D (5x10⁵ células/mL y 50.0 ng/mL) secretó la mayor cantidad de TNF- α , aunque la condición F a las 8 horas de estimulación presentó concentraciones similares (2.96x10⁴ TNF- α /cultivo vs. 2.78x10⁴ TNF- α /cultivo). Por lo tanto, las condiciones que secretaron la mayor cantidad de IL-8 y TNF- α en monocitos humanos fueron 5x10⁵ células/mL (500 μ L/pozo) con 50.0 ng/mL de LPS y 4 horas de exposición.

Figura 3. Moléculas de citoquina secretadas por monocitos humanos estimulados con respecto a moléculas de lipopolisacárido.

LPS: lipopolisacárido bacteriano. A – F: proporciones de LPS: célula detalladas en la Tabla 1.

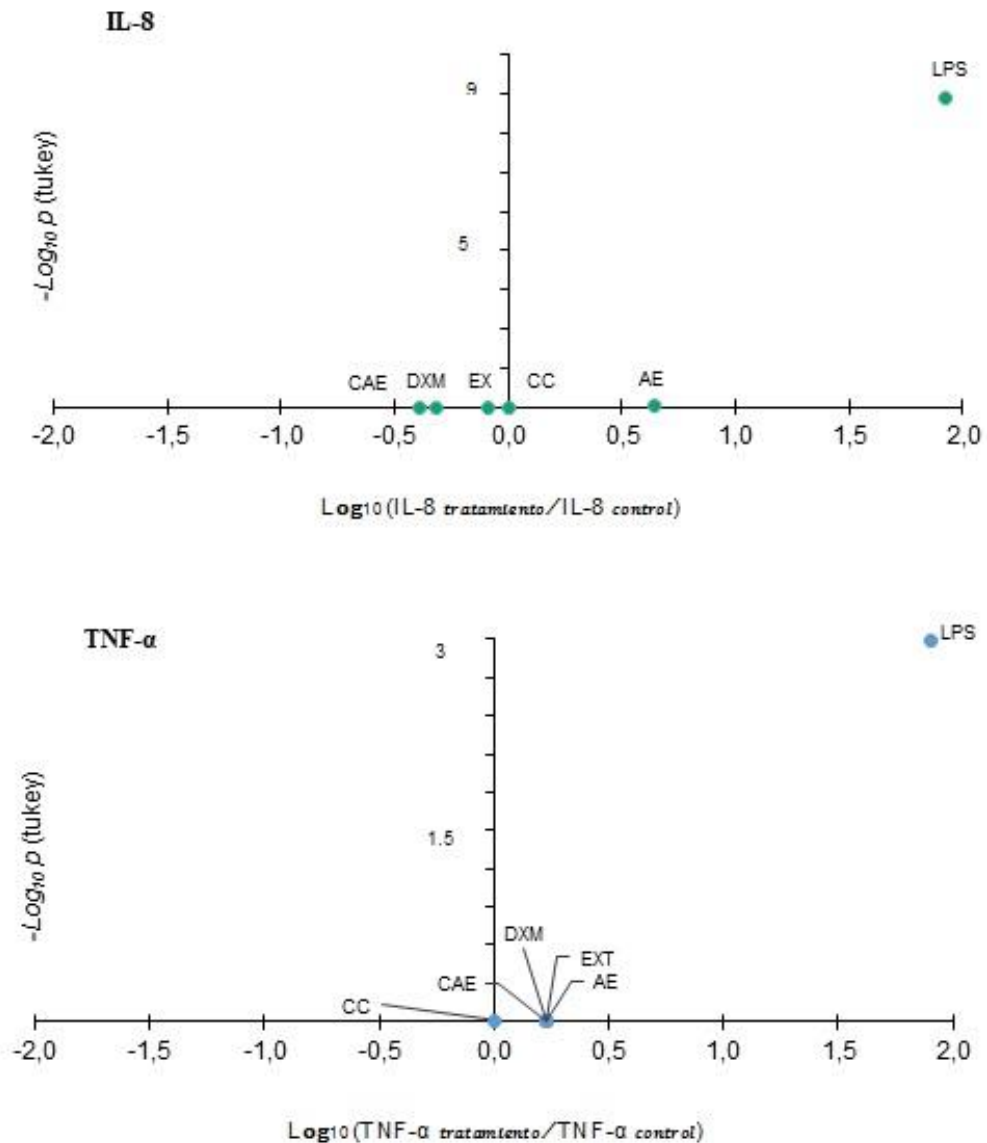


3.2.3 Actividad de *Lippia origanoides*

Para determinar el efecto del aceite esencial, β -cariofileno y extracto SFE de *L. origanoides* sobre IL-8 y TNF- α en monocitos humanos, se midieron los niveles de estas dos citoquinas en el sobrenadante celular. Cada uno de los tratamientos se comparó con el control celular y con el LPS el cual produjo 84,5 veces más que el control celular e indujo significativamente ($p=1.24 \times 10^{-8}$) la secreción de IL-8 así como la secreción de TNF- α ($p=0.0009$). Por otra parte, con los demás tratamientos no se observó un efecto significativo sobre ninguna de las dos citoquinas (Figura 4). Lo anterior sirvió como validación del modelo para la detección de sustancias que inducen la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en células humanas y además permitió evidenciar que ninguna de las muestras por si mismas induce un incremento en la secreción de las citoquinas evaluadas.

Figura 4. Efecto de las muestras sobre la secreción de citoquinas por monocitos humanos no-estimulados.

Lippia origanoides: AE= aceite esencial, EXT=extracto, CAE= β -cariofileno componente de AE. DXM= dexametasona (droga control). En el eje Y se representan los valores de p $-\text{Log}_{10}$.



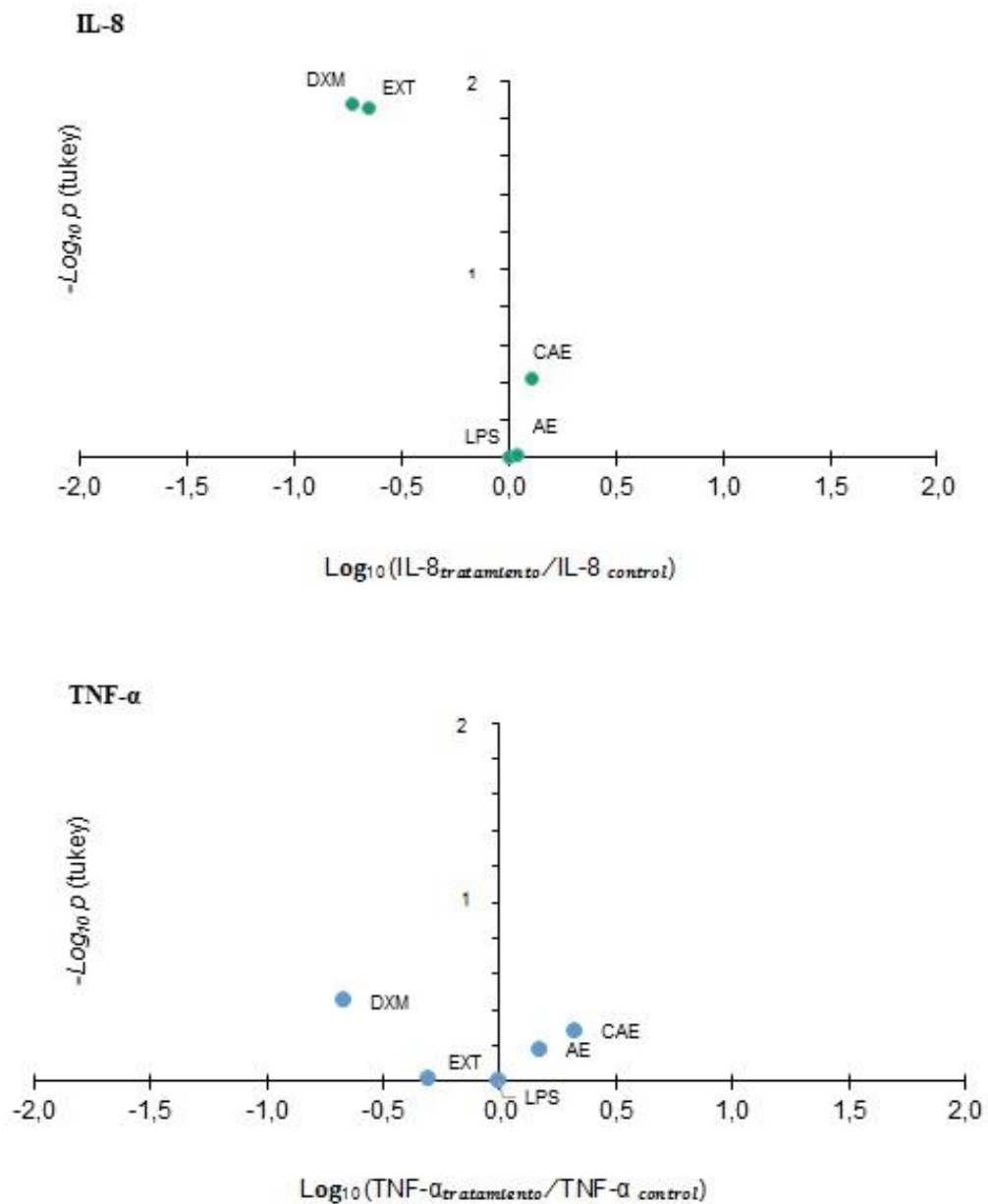
Para evaluar el potencial inhibitorio de cada una de las muestras, los monocitos humanos fueron estimulados con 50.0 ng/mL de LPS y simultáneamente tratados con cada una de las muestras evaluadas durante 4 horas. La secreción de IL-8 y TNF- α de las células expuestas a cada uno de los tratamientos se comparó con respecto a las células que solo fueron expuestas a LPS.

Para IL-8, se observó que el tratamiento con el extracto SFE de *L. origanoides* produjo 0.65 veces menos IL-8 con respecto al tratamiento con LPS, mientras que la dexametasona produjo 0.73 veces menos IL-8 con respecto al tratamiento con LPS ($p < 0.05$), esto sugiere que el extracto SFE actúa sobre los monocitos humanos de manera comparable a la dexametasona, utilizada como control positivo de la actividad inhibitoria (Figura 5). Por otra parte, los tratamientos con el aceite esencial y β -cariofileno no mostraron actividad inhibitoria sobre IL-8 en los monocitos humanos.

Para TNF- α , se observó que ninguno de los tratamientos evaluados inhibió la secreción de esta citoquina significativamente, a pesar que los tratamientos con el aceite esencial y β -cariofileno parecían estimular su secreción, esto no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento con LPS (Figura 5).

Figura 5. Efecto de las muestras sobre la secreción de citoquinas por monocitos humanos estimulados.

Lippia origanoides: AE= aceite esencial, CAE: β -cariofileno componente de AE. EXT: extracto. DXM: dexametasona (droga control). En el eje Y se representan los valores de p $-\text{Log}_{10}$.



4. DISCUSIÓN

Los ensayos basados en células son una alternativa para estudiar diversas propiedades biológicas de productos de plantas. Se logra identificar moléculas, compuestos o mezclas que podrían modular una o varias vías de señalización celular que activan diversos procesos celulares (Young, 1998; Calixto *et al.*, 2004). Su importancia surge debido a la capacidad de imitar un ambiente fisiológico celular, con redes metabólicas intactas y mecanismos de control de retroalimentación (An & Tollyday, 2010). La detección de cambios en el nivel de una o varias citoquinas secretadas por las células en cultivo, es uno de los procedimientos más aceptados para evaluar el efecto inmunomodulador *in vitro* de una muestra (Castro *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2013).

El LPS es ampliamente utilizado en ensayos basados en célula para evaluar la activación de células del sistema inmune, debido a que se une a receptores tipo Toll (TLR-4) que se encuentran sobre la membrana de los monocitos (Guha & Mackman, 2001) y esta interacción activa diferentes vías de señalización que conducen a la secreción de citoquinas (Lu *et al.*, 2008). Esta respuesta varía ampliamente *in vivo* debido a que la población de monocitos es heterogénea con respecto a los receptores de membrana que capturan la señal (Schildberger *et al.*, 2013), sin embargo, esa variación se controló dado que la línea celular THP-1 está constituida por células con el mismo repertorio genético (Chanput *et al.*, 2014). En este estudio se implementó y optimizó un ensayo basado en una célula humana del sistema inmune, que permitió evaluar el efecto de productos derivados de *L. organoides* sobre la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Diferentes estudios han demostrado que la concentración de citoquinas secretadas por monocitos humanos estimulados *in vitro* con LPS, es dependiente del número de células usadas en el ensayo (Reis *et al.*, 2008; Schildberger *et al.*, 2010). Más aún la concentración puede variar de célula a célula debido a los eventos aleatorios que rigen la expresión de genes (Becskei *et al.*, 2001; Elowitz *et al.*, 2002). En

consecuencia, la relación directamente proporcional entre el incremento en el número de células y la concentración de citoquinas no necesariamente refleja que la población de células se activó. Considerando esa variación célula-célula, fue necesario corregir el efecto de la covarianza, para esto se asumió que la molécula inductora (LPS) se une al receptor en cada célula con la misma afinidad y por el mismo tiempo, así que la activación de las vías intracelulares es similar. Este escenario ha sido descrito por Ferrell & Machleder, (1998).

El ensayo basado en monocitos humanos, se usó para evaluar si las muestras de *L. origanoides* actúan de manera similar al LPS induciendo la secreción de citoquinas en células no estimuladas. Con ninguna de las muestras se observó efecto (Figura 4). Este resultado sugiere que a la concentración evaluada las muestras por sí mismas, no activan vías de señalización intracelular que participan en el proceso inflamatorio.

La secreción de las citoquinas estudiadas es una respuesta celular a la activación de la vía de señalización del factor de transcripción NF-kappa β y de la vía de las quinasas MAPK (Faure *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2008; Montoya-Rodríguez *et al.*, 2014). Estas vías se activan *in vivo* en procesos inflamatorios e *in vitro* en monocitos LPS-estimulados (Yanamoto & Gaynor, 2001; Uings *et al.*, 2005).

La actividad inhibitoria de las muestras sobre la inducción de citoquinas mediada por LPS también se evaluó en este estudio. El extracto SFE inhibió significativamente ($p=0.03$) la secreción de IL-8 igual que la droga anti-inflamatoria (dexametasona) usada como control (Figura 5). Este resultado sugiere que la mezcla o alguno de los componentes del extracto podrían estar inactivando el receptor y otros componentes de una de las vías que conducen a la secreción de IL-8. Los componentes químicos del extracto SFE incluido en este estudio se desconocen sin embargo, la caracterización está en curso. En preparaciones incluidas en otros estudios del CENIVAM se detectaron flavonoides en altas concentraciones (Stashenko *et al.*, 2013), entre ellas la pinocembrina es uno de los más frecuentes y se ha demostrado que inhibe la secreción *in vitro* e *in vivo* de

citoquinas inducidas por LPS (Somorou *et al.*, 2012). De otros flavonoides como luteolin y naringenina se ha reportado efecto inhibitorio sobre la secreción de IL-8 (Kim *et al.*, 2005; Bodet *et al.*, 2008) y se ha encontrado que los flavonoides tienen actividad como moduladores naturales y actividad *in vivo* como agentes anti-inflamatorios (Kim *et al.*, 2004).

Resulta difícil dar una explicación al mecanismo de acción del extracto SFE sobre la secreción de IL-8 por varias razones. La primera de ellas radica en el hecho de que la mezcla del extracto contiene más de un componente el cual puede solo, o de forma sinérgica ser el responsable de la actividad inhibitoria. La segunda razón, es que la actividad biológica del extracto no sea sobre las células, sino que las moléculas presentes interactúan de forma directa con el LPS, aumentando o disminuyendo la afinidad por su receptor específico.

Al contrario de lo observado con IL-8, el tratamiento con extracto SFE no inhibió TNF- α en monocitos LPS-estimulados y lo mismo se observó con la droga control dexametasona. Esto puede deberse a que las concentraciones de extracto SFE y dexametasona usadas en el ensayo no interfieren en las vías que activan *in vitro* esta citoquina.

La composición química de la preparación del aceite esencial incluido en este estudio, está en curso en el CENIVAM. En una preparación para otro estudio se detectaron varios terpenos como componentes mayoritarios: timol, carvacrol y β -cariofileno (Stashenko *et al.*, 2013). Se ha demostrado que estos terpenos tienen actividad anti-inflamatoria tópica relacionada con mecanismos de acción que contribuyen a la modulación de citoquinas (Balakrishnan *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos por Veras *et al.* (2012), muestran que el tratamiento tópico con aceite esencial redujo la producción de citoquinas pro-inflamatorias en pacientes con inflamación aguda.

El aceite esencial seleccionado para este estudio no tuvo efecto modulador sobre la secreción de las dos citoquinas. El resultado puede deberse a varios factores:

i) el tipo de ensayo no lo permitió debido a que en estudios *in vivo* se ha observado la disminución de citoquinas en parte porque las citoquinas están siendo secretadas por diversas células en alta concentración, en cambio, en los estudios *in vitro*, donde no aparecen ciertos estímulos su concentración disminuye (Riella *et al.*, 2012) ii) el aceite esencial o uno de sus componentes interactúe con las citoquinas presentes en el sobrenadante y esto impida que sea detectada en el ensayo ELISA; iii) el aceite esencial o uno de sus componentes se una al LPS e inhiba la interacción con el receptor de la membrana celular de los monocitos humanos y por lo tanto la célula no es señalizada. Así, es necesario para confirmar el mecanismo del efecto inhibitorio sobre las citoquinas realizar experimentos más detallados de biología celular.

El componente β -cariofileno no tuvo efecto modulador sobre la secreción de las dos citoquinas. Este resultado es distinto a los obtenidos previamente en el CINTROP (Flechas & Ocazonez, 2014), usando células hepáticas humanas en donde el terpeno β -cariofileno redujo cerca del 80% la secreción de IL-8. Se requieren experimentos adicionales en monocitos para confirmar o descartar inequívocamente la ausencia del efecto sobre monocitos LPS-estimulados.

5. CONCLUSIONES

- El ensayo basado en células implementado en el presente estudio, es una herramienta útil para evaluar la actividad de muestras biológicas sobre la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como interleucina 8 y el Factor de Necrosis Tumoral alfa.
- El aceite esencial, β - cariofileno y extracto SFE de *Lippia origanoides* no tuvieron efecto modulador sobre las citoquinas secretadas por monocitos no estimulados con LPS. Este resultado sugiere que las muestras o alguno de sus componentes por si mismos no presentan efecto alergénico bajo las condiciones usadas en el estudio ni estarían activando vías de señalización celular que conduce a la secreción de IL-8 y TNF- α .
- Se evidenció que el extracto SFE de *Lippia origanoides* tuvo efecto inhibitorio sobre la secreción de IL-8 en monocitos estimulados con LPS. Este resultado sugiere que el extracto SFE contiene componentes con efecto anti-inflamatorio y por lo tanto, podría servir como fuente natural en futuros estudios.
- El aceite de *Lippia origanoides* y su metabolito β -cariofileno no mostraron efecto inhibitorio sobre la secreción de IL-8 ni TNF- α sobre monocitos humanos estimulados con LPS. Se requieren más estudios para clarificar el efecto anti-inflamatorio de estas muestras.

6. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE

- Conoce los principios básicos del diseño de un estudio científico.
- Adquirió habilidad técnica para mantenimiento y cultivo *in vitro* de la una línea celular.
- Adquirió experiencia en el manejo de equipos, preparación de los medios de cultivo y soluciones necesarias para el desempeño de cada experimento.
- Desarrolló habilidades y destrezas para analizar muestras usando el inmunoensayo ligado a enzima.
- Conoce los principios básicos de escritura de un documento científico.
- Fortaleció el sentido de responsabilidad con compromisos académicos y entrega de informes.
- Fortaleció la ética y moralidad

BIBLIOGRAFÍA

1. Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M & Akdis, C. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701–721.
2. Amirghofran, Z. (2012). Herbal Medicines for Immunosuppression. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 11(2), 111–119.
3. Anaya, J. (2003). Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología.*, 19(2), 112–120.
4. An, W & Tolliday, N. (2010). Cell-based assays for high-throughput screening. *Molecular Biotechnology*, 45(2), 180–186.
5. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
6. Balakrishnan, G., Janakarajan, L., Balakrishnan, A & Lakshmi, B. (2010). Molecular basis of the anti-inflammatory property exhibited by cyclo-pentano phenanthrenol isolated from *Lippia nodiflora*. *Immunological Investigations*, 39(7), 713–39.
7. Bernal, H.Y., García, M & Quevedo, G. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia: Estrategia nacional para la conservación de plantas. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.* 22–23.
8. Becskei, A., Seraphin, B & Serrano, L. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks : cell differentiation by graded to binary response conversion. *European Molecular Biology Organization*, 20(10), 2528–2535.
9. Beutler, B & Rietschel, E. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews. Immunology*, 3(2), 169–176.

10. Bodet, C., La, V., Epifano, F & Grenier, D. (2008). Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *Journal of Periodontal Research*, 43(3), 400–407.
11. Bosch, I., Khaja, K., Estevez, L., Raines, G., Melichar, H., Warke, R., Fournier, M., Ennis, F & Rothman, A. (2002). Increased Production of Interleukin-8 in Primary Human Monocytes and in Human Epithelial and Endothelial Cell Lines after Dengue Virus Challenge. *Journal of Virology*, 76(11), 5588–5597.
12. Burns, J., Zhao, L., Taylor, E & Spelman, K. (2010). The influence of traditional herbal formulas on cytokine activity. *Toxicology*, 278(1), 140–159.
13. Calixto, J., Campos, M., Otuki, M & Santos, A. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, 70(11), 93–103.
14. Castro, J., Vado, I., Perez, C & Fredeking, T. (2011). Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clinical & Developmental Immunology*, 1–5.
15. Chanput, W., Mes, J & Wichers, H. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45.
16. Choudhury, S. S., Bashyam, L., Manthapuram, N., Bitla, P., Kollipara, P., & Tetali, S. D. (2014). Ocimum sanctum leaf extracts attenuate human monocytic (THP-1) cell activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(1), 148–155.
17. Chung, M. J., Kim, J., Lee, S., Kim, T., Kim, D., Baek, J & Choe, M. (2012). Suppressive effects of Schizandra chinensis Baillon water extract on allergy-related cytokine generation and degranulation in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells, 6(2), 97–105.

18. Dos Santos, F., Lopes, A., Cito, A., Oliveira, E., Lima, S & Reis, F. (2004). Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H . B . K . *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 504–506.
19. Elowitz, M., Levine, A., Siggia, E & Swain, P. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 297(2), 1183–1186.
20. Faure, E., Equils, O., Sieling, P., Thomas, L., Zhang, F., Kirschning, C., Polentarutti, N., Muzio, M & Arditi, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 11058–11063.
21. Ferrell, J & Machleder, E. (1998). The Biochemical Basis of an All-or-None Cell Fate Switch in *Xenopus* Oocytes. *Science*, 280, 895–898.
22. Flechas Alarcón, M.A & Ocazonez, R.E (2014). Potencial antiviral e inmunomodulador de antibióticos y componentes de aceites esenciales sobre el virus del dengue. *Tesis de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad Industrial de Santander.*
23. Gómez, L.A., Stashenko, E & Ocazonez, R. E. (2013). Comparative Study on In Vitro Activities of Citral, Limonene and Essential Oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on Yellow Fever Virus. *Natural Product Communications*, 8(2), 249–252.
24. Guha, M. & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13, 85–94.
25. Gupta, S., Indelicato, S., Jethwa, V., Kawabata, T., Kelley, M., Mire-Sluis, A., Richards, S., Rup, B., Shores, E., Swanson, S & Wakshull, E. (2007). Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *Journal of Immunological Methods*, 321(1-2), 1–18.
26. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(5), 847–855.

27. Jeong, S., Koyyalamudi, S., Hughes, J., Khoo, C., Bailey, T., Park, J & Song, C. (2013). Modulation of cytokine production and complement activity by biopolymers extracted from medicinal plants. *Phytopharmacology*, 4(1), 19–30.
28. Kumar, S., Kumar, S., Rehman, I., Dhyani, P., Kumari, L., Acharya, S., Bora, G., Durgapal, P & Kumar, A. (2012). Molecular herbal inhibitors of Dengue virus : an update. *International Journal in Medicine and Aromatics Plants*, 2(1), 1–21.
29. Kim, H., Son, K., Chang, H & Kang, S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96, 229–245.
30. Kim, J., kim, D., Kang, O., Choi, Y., Park, H., Choi, S., Kim, T., Yun, K., Nah, Y & Lee, Y. (2005). Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 5(1), 209–217.
31. Lu, Y., Yeh, W & Ohashi, P. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145–151.
32. Lu, C., Kuo, H., Wang, F., Jou, M., Lee, K & Chuang, J. (2014). Upregulation of TLRs and IL-6 as a Marker in Human Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 159–177.
33. Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H & Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicology in Vitro*, 21(3), 428–437.
34. Montoya-Rodriguez, A. González de Mejía, E., Dia, V., Reyes-Moreno, C & Milán-Carrillo, J. (2014). Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF-κB signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(5), 1028–1041.

35. Mózes, T., Baráth, I., Gornicsar, K., Groosz, A., Mózes, T., Gondocs, C., Szephalmi, P., Gaál, K & Madarász, E. (2011). Deviations in circulating TNF α levels and TNF α production by mononuclear cells in healthy human populations. *Mediators of Inflammation*, 2011, 1–8.
36. Ocazonez, R., Meneses, R., Torres, F & Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304–309.
37. Oliveira, D., Leitao, G., Fernandes, P & Leitao, S. (2014). Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 206–214.
38. Oppenheim, J. (2001). Cytokines: past, present, and future. *International Journal of Hematology*, 74(1), 3–8.
39. Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 201–214.
40. R Core Team (2013) [R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.]
41. Reis, S., Valente, L., Sampaio, A., Siani, A., Gandini, M., Azeredo E., D'Ávila, L., Mazzei, J., Henriques, M & Kubelka, C. (2008). Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International Immunopharmacology*, 8(3), 468–476.
42. Riella, K.R; Marinho, R.R; Santos, J.S., Pereira-Filho, R.N., Cardoso, J.C., Albuquerque-Junior, R.L.C & Thomazzi, S.M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 656-663.
43. Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K & Weber, V. (2013). Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2010.

44. Schildberger, A., Rossmannith, E., Weber, V & Falkenhagen, D. (2010). Monitoring of endothelial cell activation in experimental sepsis with a two-step cell culture model. *Innate Immunity*, 16(5), 278–287.
45. Silva-Lima, M., Quintans-Junior, L., Santana, W., Kaneto, C., Soares, M & Villareal, C.-. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology*, 699, 112–117.
46. Soromou, L., Chu, X., Jiang, L., Wei, M., Huo, M., Chen, N., Guan, S., Tang, X., Chen, C., Feng, H & Deng, X. (2012). In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *International Immunopharmacology*, 14(1), 66–74.
47. Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. a, Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103.
48. Stashenko, E., Martínez, J., Cala, M., Durán, D & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), 192–202.
49. Tisonick, J., Korth, M., Simmons, C., Farrar, J., Martin, T & Katze, M. (2012). Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 16–32.
50. Tsurufuji, S., Sugio, K & Takemasa, F. (1979). The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Nature*, 280(2), 408–410.
51. Uings, I., Puxeddu, I., Temkin, V., Smith, S., Fattanh, D., Ray, K & Levi-Schaffer, F. (2005). Effects of dexamethasone on TNF-alpha-induced release of cytokines from purified human blood eosinophils. *Clinical and Molecular Allergy : CMA*, 3, 1–5.

52. Veras, H., Araruna, M., Costa, J., Coutinho, H., Kerntopf, M., Bitelho, M & Menezes, I. (2012). Topical Anti inflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. *Phytotherapy Research*, 27(2), 179-185.
53. Yamamoto, Y & Gaynor, B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(2), 135–142.
54. Young, P. (1998). Pharmacological Modulation of Cytokine Action and Production through Signaling Pathways. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(3-4), 239–257.
55. Zare Shahneh, F., Valiyari, S., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Bandehagh, A., Azadmehr, A & Hajiaghaee, R. (2013). Inhibitory and Cytotoxic Activities of *Salvia Officinalis* L . Extract on Human Lymphoma and Leukemia Cells by Induction of Apoptosis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 51–55.
56. Zeilhofer, H & Schorr, W. (2000). Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Current Opinion in Hematology*, 7(3), 178–182.