

ARTÍCULO ORIGINAL

Neuroprotección mediada por diterpenos aislados de *Sideritis* spp. frente al estrés oxidativo en astrocitos
Results from the application of a quality management system in the community pharmacy

González-Burgos E, Palomino, OM, Carretero ME, Gómez-Serranillos, MP

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España
egonzalezburgos@hotmail.com

RESUMEN

La presente investigación aborda el estudio de las propiedades neuroprotectoras, en base a la capacidad antioxidante, de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol aislados de diferentes especies del género *Sideritis*. La actividad protectora de estos compuestos fue evaluada en un modelo de estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno sobre la línea celular U373 MG de astrocitoma humano. Los resultados mostraron que un pretratamiento durante 24 horas con los diterpenos del estudio, previo a la exposición del peróxido de hidrógeno 1 mM durante 30 minutos, incrementa de manera significativa la viabilidad celular comparado con las células tratadas únicamente con peróxido de hidrógeno. Además, los diterpenos revertieron los cambios morfológicos inducidos por el peróxido de hidrógeno. Este efecto protector se debe en parte a la capacidad de estos compuestos para captar los radicales libres generados por el peróxido de hidrógeno, efecto atribuido a su propiedad como antioxidantes tal y como revela el ensayo DPPH. Se sugiere que estos diterpenos aislados de *Sideritis* spp., podrían ejercer un efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de aquellas enfermedades neurodegenerativas asociadas al estrés oxidativo incluidas el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

PALABRAS CLAVE: Farmacia Comunitaria, Sistemas de Gestión de la Calidad, Indicadores de Gestión

ABSTRACT

The quality management means the search of the continuous improvement in the activities and processes, with the aim of reaching the full satisfaction of the needs and requirements of our costumers. That is why we have to take management decisions that must be based in objective data and facts.

We wanted to know if the application of a Quality Management System in the Community Pharmacy means a significant improvement in the processes related to the management of the pharmacies, the pharmaceutical care given to the costumers / patients, and their satisfaction level.

The results of sixteen different processes indicators, obtained from several community pharmacies (1 to 7 depending on the indicator) that have established a Quality Management System according to the ISO 9001 Norm, were normalized. The time trend of every indicator was adjusted to a straight line, and we analysed, with the F test if the slope was different of 0, considering it significant if $p < 0.05$.

The improvement percentages in ten of the sixteen indicators (low rotation articles stock, suppliers errors, percentage of valued pharmacy advices, symptoms improvement, patients who received health education, drug-related negative clinical outcomes detected, informed consent obtaining, cosmetics produced, points in the satisfaction questioner and points in the mystery shopping test), showed a positive trend that was statistically significant.

All these results prove that the application of a Quality Management System makes it possible to control and measure the most important processes and activities of a community pharmacy, and the satisfaction of its patients/costumers.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 617-627.

KEYWORDS: Community Pharmacy, Quality Management Systems, Management Indicators.

INTRODUCCIÓN

El concepto de enfermedades neurodegenerativas engloba más de 100 tipos diferentes de desórdenes neurológicos, de tipo crónico y curso progresivo, caracterizados por una pérdida gradual de las neuronas, afectando a los sistemas cognitivo, sensorial y motor¹. El principal factor de riesgo del desarrollo de las mismas es la edad^{2,3}.

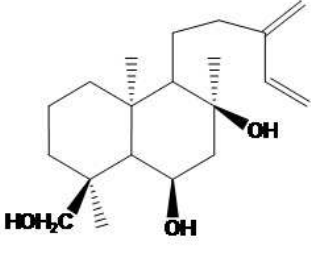
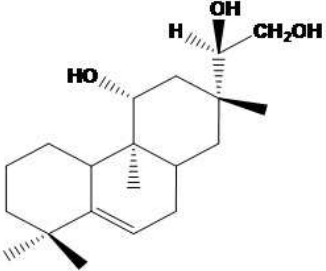
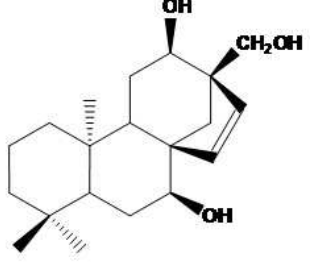
En los últimos años, el estrés oxidativo se ha implicado en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas incluidas la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica^{4,5}. El estrés oxidativo es aquella situación de desequilibrio redox que se produce cuando los radicales libres generados superan la capacidad antioxidante del organismo, constituida por un sistema enzimático (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reducido) y un sistema no enzimático (glutatión). Esto conduce a un daño a nivel del DNA, lípidos y proteínas⁶.

El alto nivel metabólico del cerebro, unido a su elevado contenido en ácidos grasos insaturados, su baja concentración en defensas antioxidantes y su capacidad reducida para la regeneración celular comparada con otros órganos, hacen del mismo un órgano particularmente susceptible al estrés oxidativo^{7,8}. Numerosas evidencias han demostrado que compuestos capaces de reducir o prevenir el daño provocado por los radicales libres como determinados polifenoles, entre ellos flavonoides o terpenos, pueden ser agentes potenciales en el tratamiento o prevención de aquellas enfermedades asociadas al estrés oxidativo^{9,10,11}.

El género *Sideritis* comprende más de 150 especies distribuidas en toda la región Mediterránea desde el Cáucaso hasta las Islas Canarias. Tradicionalmente, infusiones y decocciones preparadas a partir de las partes aéreas de *Sideritis* spp., han sido utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, digestivas y antimicrobianas. Estas actividades se atribuyen a su alto contenido en flavonoides, diterpenos y aceites esenciales. Más de 150 diferentes tipos de diterpenos han sido aislados de las especies de *Sideritis*, entre los que se encuentran el andalusol (diterpeno tipo labdano), el conchitriol (diterpeno tipo beyerano) y el lagascatriol (diterpeno tipo rosano)¹². Estudios previos han demostrado que el andalusol y el lagascatriol presentan actividad antiinflamatoria^{13,14,15}, mientras que no existe ningún estudio farmacológico del diterpeno conchitriol.

El objetivo de este trabajo es el de evaluar el efecto neuroprotector de los diterpenos andalusol, conchitriol y lagascatriol (Fig.1), aislados de las partes aéreas de *Sideritis* spp., frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en la línea celular U373 MG de astrocitoma humano.

Fig.1. Estructura química de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol

DITERPENOS		
Bicíclico	Tricíclico	Tetracíclico
Derivado del labdano	Derivado del rosano	Derivado del beyerano
		
ANDALUSOL <i>(S. arborescens)</i>	LAGASCATRIOL <i>(S. angustifolia)</i>	CONCHITRIOL <i>(S. angustifolia)</i>

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

El medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), el suero fetal bovino (FBS) y la tripsina-EDTA se compraron a Invitrogen (Carlsberg, CA, USA). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA) y el peróxido de hidrógeno procedían de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El dimetil sulfóxido (DMSO) fue suministrado por Panreac (Barcelona, Spain).

Material vegetal

Los diterpenos andalusol, conchitriol y lagascatriol se aislaron de las partes aéreas de la especie del género *Sideritis*^{16,17,18,19}. Los diterpenos se disolvieron en DMSO y se realizaron diluciones seriadas en PBS, siendo la concentración final de DMSO en las células menor de 0,1%.

Cultivo celular

Se ha utilizado la línea celular de astrocitoma humano U373 MG procedente de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC). Las células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%) y gentamicina (0,5%) a 37°C en atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO₂.

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para determinar la supervivencia y la proliferación celular se ha empleado el ensayo de MTT descrito por Mossman²⁰. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los diterpenos del estudio (5, 10, 25, 50 y 100 μM) durante 24 horas, previo a la exposición con peróxido de hidrógeno durante 30 minutos. Pasadas 24 horas, se eliminó el medio y se incubaron las células con MTT (2 mg/mL) durante 1 hora a 37°C. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 100 μL DMSO. La medición se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm usando un lector de placas (Digiscan 340).

Medida de la generación intracelular de radicales libres (técnica de la diclorofluoresceína)

La medida de la generación de radicales libres se determinó mediante la técnica del diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA)²³. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 U373-MG células/pocillo durante 24 horas. Pasado este tiempo, las células se incubaron en una solución de PBS glucosado que contenía DCFH-DA durante 30 minutos en oscuridad a 37°C. A continuación, las células se lavaron con PBS glucosado y se trataron con los diterpenos del estudio a las concentraciones de 5 y 10 μM y con 1mM de peróxido de hidrógeno. La fluorescencia emitida se leyó a intervalos de 10 minutos dentro de la primera hora y de 30 minutos dentro de la segunda hora a una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 510 nm en un Fluorímetro Lector de microplacas FLx800, Bio-Tek, Instruments, Inc. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de radicales libres producidos.

Medida de la capacidad de captación de radicales libres (DPPH)

La capacidad de los diterpenos en estudio para captar el radical estable DPPH se midió siguiendo el método de Molyneux (2004), con algunas modificaciones. La medida se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 517 nm en un lector de placas Versamax tunable.

Análisis estadístico

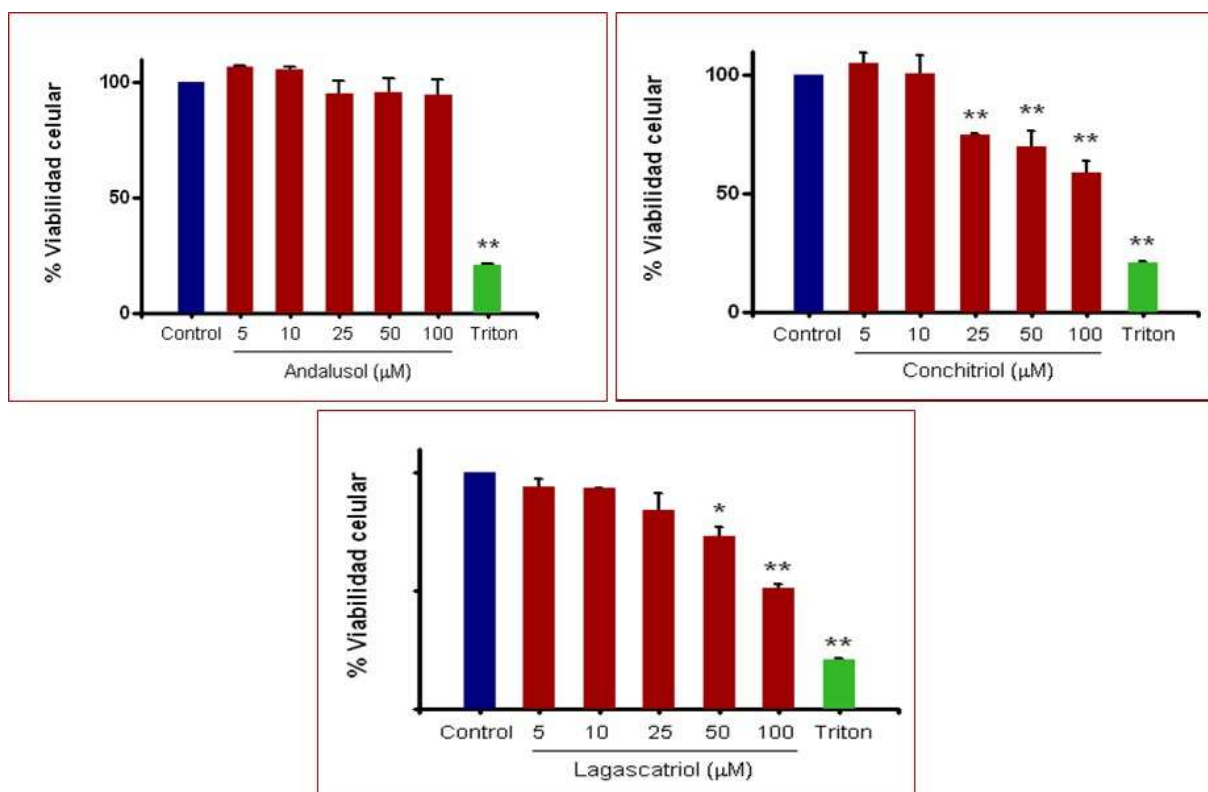
Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como valores promedios \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por medio del análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey's, utilizando un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Efectos del andalusol, conchitriol y lagascatriol sobre la viabilidad de las células U373 MG

Inicialmente, se estudió el efecto de un tratamiento durante 24 horas de diferentes concentraciones de los diterpenos (5, 10, 25, 50 y 100 μM) sobre la viabilidad de las células U373-MG mediante el ensayo de MTT. Los resultados revelaron que ninguna de las concentraciones ensayadas para el andalusol modificó la viabilidad de las células U373-MG comparado con las células control. Sin embargo, las concentraciones más altas ensayadas para el conchitriol (25, 50 y 100 μM) y el lagascatriol (50 y 100 μM) mostraron un decrecimiento en la viabilidad celular concentración – dependiente. El tritón se utilizó como control negativo de viabilidad celular al causar la muerte por lisis (Fig.2).

Fig.2. Efecto del tratamiento durante 24 horas de diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 μM) de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol sobre la viabilidad de las células U373 MG de astrocitoma humano.

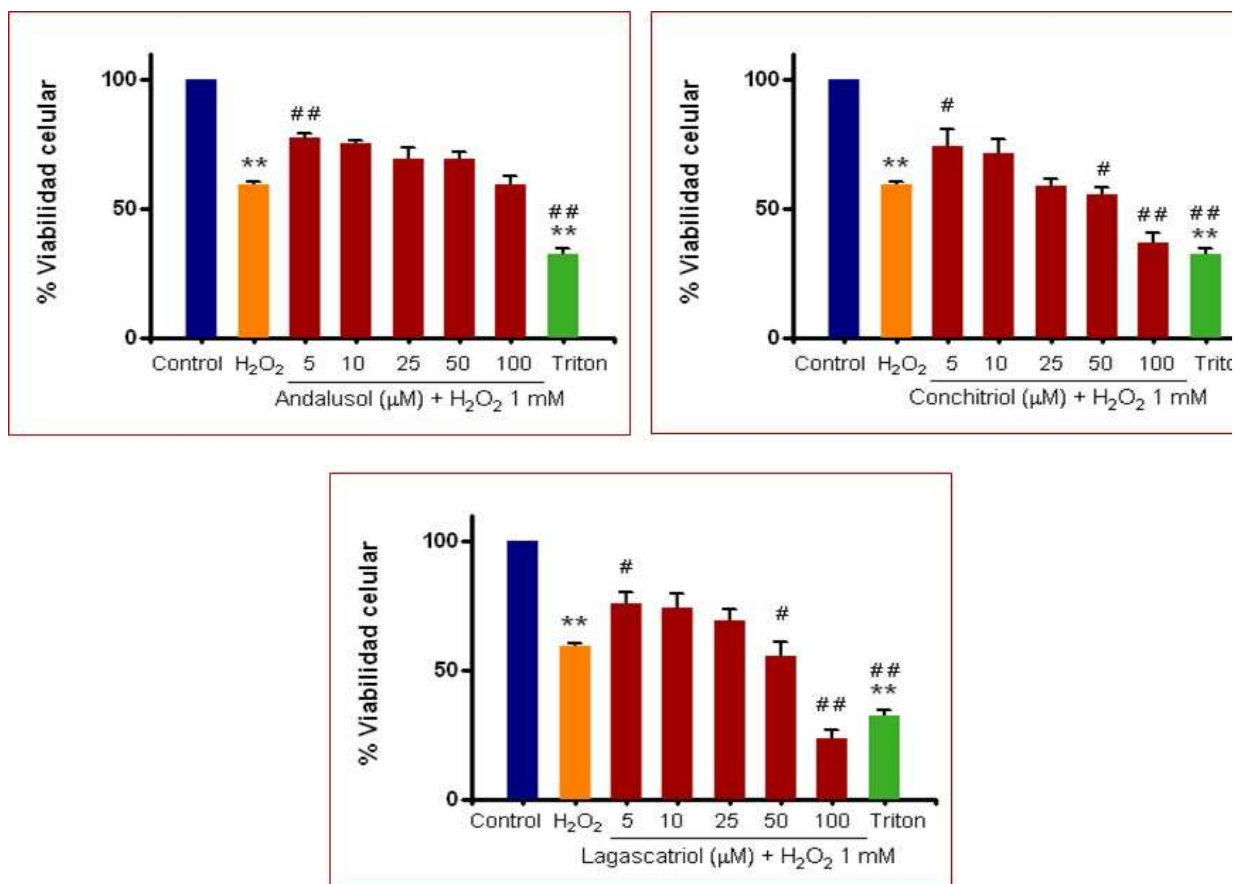


Efecto neuroprotector de los diterpenos frente al daño inducido por el peróxido de hidrógeno sobre las células U373 MG

Se ha evaluado el efecto de un pretratamiento durante 24 horas de los diterpenos del estudio. El ensayo de MTT reveló que el peróxido de hidrógeno causa una reducción de un

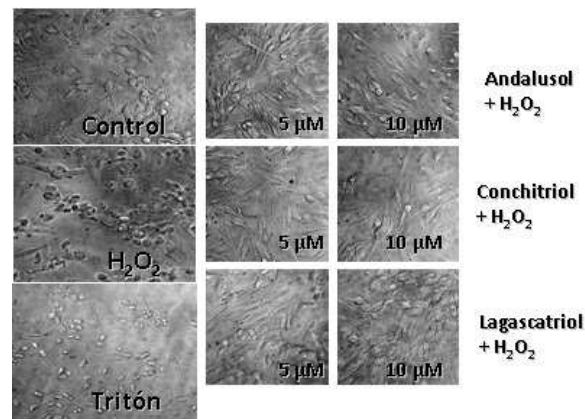
41% comparado con las células control. El pretratamiento durante 24 horas con los diterpenos del estudio (5 y 10 μM), previo a la exposición del peróxido de hidrógeno 1 mM durante 30 minutos, incrementó de manera significativa la viabilidad celular comparado con las células tratadas únicamente con peróxido de hidrógeno (Fig.3).

Fig.3. Efecto neuroprotector de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol en un modelo de estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno. Las células U373 MG fueron tratadas con diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 μM) de los diterpenos durante 24 horas, previo a una exposición de peróxido de hidrógeno 1mM durante 30 minutos.



Para completar este estudio, se evaluó la morfología de las células tras los tratamientos mediante un microscopio de contraste de fase. Las células control presentaban una morfología estrellada característica. Sin embargo, cuando las células se trataron con el peróxido de hidrógeno 1mM durante 30 minutos, perdieron sus ramificaciones, adquiriendo formas redondeadas. El pretratamiento durante 24 horas con los diterpenos del estudio, previo al tratamiento con el peróxido de hidrógeno, revertió los cambios morfológicos inducidos por el peróxido de hidrógeno, presentando las células su aspecto normal estrellado (Fig.4).

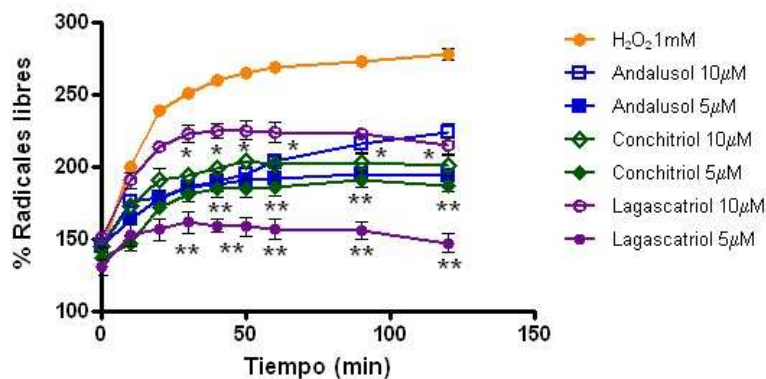
Fig.4. Efecto sobre la morfología de las células U373 MG de los diferentes tratamientos.



Efecto de los diterpenos en la producción de radicales libres inducida por el peróxido de hidrógeno

A continuación se evaluó el efecto de los diterpenos sobre la producción de radicales libres inducido por el peróxido de hidrógeno durante dos horas. En presencia de iones metálicos como el ion ferroso o el ion cuproso, se produce la escisión del enlace del peróxido de hidrógeno generándose el radical hidroxilo²¹. Cuando las células fueron tratadas con los diterpenos (5 y 10 μM) y el peróxido de hidrógeno, la cantidad de radicales libres se vio atenuada de manera significativa. El compuesto más activo resultó el andalusol a la concentración de 5 μM. Este efecto de los diterpenos sobre la producción de radicales libres inducida por el peróxido de hidrógeno sugiere que el efecto protector de dichos compuestos se debe a su capacidad para atenuar la producción de radicales libres (Fig.5).

Fig.5. Efecto de los diterpenos andalusol, conchitriol y lagascatriol (5 y 10 μM) sobre la producción de radicales libres inducida por el peróxido de hidrógeno 1 mM en la línea celular U373 MG.



Capacidad de captación de radicales libres

Finalmente, se evaluó la capacidad de los diterpenos a las concentraciones de 0,05; 0,025 y 0,0125 mg/mL de captar el radical estable DPPH. La vitamina E se utilizó como compuesto de referencia. A la concentración de 0,05 mg/mL, la vitamina E presentó una capacidad de captación cercana al 50%. A esta misma concentración, el andalusol presentó una capacidad antioxidante del 20%. Estos resultados sugieren que estos compuestos presentan capacidad de captar radicales libres, propiedad atribuida a la posibilidad de donar un átomo de hidrógeno (Tabla 1).

Tabla.1. Capacidad captadora de radicales libres de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol evaluada mediante el ensayo del DPPH. La vitamina E se utilizó como compuesto de referencia.

Concentración (mg/mL)	% Inhibición DPPH			
	ANDALUSOL	CONCHITRIOL	LAGASCATRIOL	VITAMINA E
0,05	21,2 ± 0,3*	15,6 ± 0,4*	21,5 ± 0,3*	45,7 ± 0,8
0,025	19,6 ± 0,6*	13,4 ± 0,8*	7,6 ± 1,2*	23,6 ± 0,5
0,0125	17,9 ± 0,2*	10,0 ± 0,9*	1,9 ± 1,1*	12,6 ± 1,1

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo se ha visto implicado como un factor causal o como una consecuencia del desarrollo patogénico de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson⁸. En los últimos años ha habido un creciente interés en la búsqueda de compuestos de origen natural que prevengan del daño oxidativo generado por los radicales libres.

Los terpenos constituyen uno de los grupos más amplio y más diverso de los productos de origen natural. Más de 25000 terpenos diferentes han sido identificados en plantas, algas, musgos, líquenes e insectos²². Sin embargo, a pesar de la abundancia y variedad de estos compuestos, son pocos los estudios centrados en evaluar su posible acción neuroprotectora.

El presente estudio describe por primera vez el efecto protector de los diterpenos andalusol, conchitriol y sidol, aislados de las partes aéreas de especies de *Sideritis*, sobre la toxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno en la línea celular U373 MG correspondiente

a astrocitoma humano.

Inicialmente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de los diterpenos (5, 10, 25, 50 y 100 μM) en la viabilidad de las células U373 MG, con el fin de establecer el rango de concentraciones no tóxicas para la línea celular del estudio. Los resultados revelaron que ninguna de las concentraciones ensayadas del andalusol modificaba la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, los diterpenos conchitriol (25, 50 y 100 μM) y lagascatriol (25, 50 μM) redujeron la viabilidad celular de manera significativa a las concentraciones señaladas.

Una vez conocidas las concentraciones no tóxicas para la línea celular U373 MG, se evaluó el posible efecto protector de estos compuestos en un modelo de estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reduce de manera significativa la viabilidad celular, posiblemente debido al daño generado por su capacidad para producir radicales libres. Los diterpenos estudiados, a las concentraciones de 5 y 10 μM , incrementaron la viabilidad celular de manera significativa comparado con las células tratadas únicamente con el peróxido de hidrógeno. Asimismo revertieron los cambios morfológicos ocasionados por el peróxido de hidrógeno (altera la morfología estrellada de las células U373 MG adquiriendo éstas formas redondeadas).

Dado que el peróxido de hidrógeno es un inductor de radicales libres, se evaluó el efecto de una aplicación exógena del mismo en la línea celular U373 MG mediante el ensayo de la diclorofluoresceína. Se observó un incremento tiempo-dependiente de radicales libres en células que habían sido tratadas solo con peróxido de hidrógeno. Sin embargo, cuando las células se trataron combinadas con el peróxido de hidrógeno y los diterpenos a las concentraciones de 5 y 10 μM , se redujo de manera significativa la producción de radicales libres en comparación con las células expuestas únicamente al peróxido de hidrógeno.

Finalmente se evaluó la capacidad antioxidante de estos compuestos mediante la técnica del DPPH. El estudio reveló que estos compuestos presentan una cierta capacidad antioxidante, propiedad a la que se puede atribuir en parte su efecto protector.

Los diterpenos estudiados son compuestos que presentan al menos dos anillos cíclicos, lo que les hace ser moléculas voluminosas, además de contener numerosos sustituyentes, fundamentalmente cadenas alílicas y grupos hidroxilo. Atendiendo a una relación estructura-actividad de los diterpenos del estudio y otros compuestos de capacidad antioxidante ampliamente contrastada como la vitamina E o diversos polifenoles, podemos plantear que los grupos hidroxilo de los diterpenos pueden reaccionar con los radicales libres dando lugar a un radical más estable y menos reactivo, por las influencias estéricas de los sustituyentes metilo y de los anillos hexánicos, presentando por ello capacidad antioxidante.

Futuras investigaciones se están encaminando a establecer y profundizar el mecanismo de acción de estos compuestos por el cual ejercen un efecto protector en células del sistema nervioso frente al estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbato, C., Ruberti, F., Cogoni, C. (2009) Searching for MIND: MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2009, 871313- 871321.
2. Daviglus M.L, Bell C.C, Berrettini W, Bowen P.E, Connolly E.S Jr, Cox N.J, Dunbar-Jacob J.M, Granieri E.C, Hunt G, McGarry K, Patel D, Potosky A.L, Sanders-Bush E, Silberberg D, Trevisan M. (2010) National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: preventing alzheimer disease and cognitive decline. *Ann Intern Med.* 153, 176-181.
3. Hindle, J.V. (2010) Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*, 39, 156-161.
4. Floyd, R.A. and Hensley, K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 23, 795-807.
5. Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 205-214.
6. Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm.* (2009) 116:1111-1162.
7. Pertusa, M., Garcia-Matas, S., Rodriguez-Farre, E., Sanfeliu, C., and Cristofol, R. (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* 101, 794-805.
8. Andersen, J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10, S18-25.
9. Naval M.V., Gómez-Serranillos, M.P., Palomino, O.M., Villar, A. and Carretero, M.E. (2007) Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary culture. *Biochim Biophys Acta*, 1770, 1308-1316.
10. Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V. and Ramassamy, C. J. (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Agric Food Chem*, 56, 4855-4873.
11. Zhao, B. (2009) Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 34, 630-638.
12. González-Burgos, E.; Gómez-Serranillos, M.P.; Palomino, O.M. and Carretero, M.E. (2009) The genus *Sideritis*: botanical and pharmacological aspects. *Rev.Fitoter.*, 9, 133-145.
13. Navarro, A., de las Heras, B. and Villar, A.M. (1997) Andalusol, a diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Sideritis foetens* Clemen. *Z Naturforsch*, 52c, 844-849.
14. de las Heras, B., Abad, M.J., Silván, A.M., Pascual, R., Bermejo, P., Rodríguez, B. and Villar, A.M. (2001) Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sci*, 70, 269-278.
15. de las Heras, B., Navarro, A., Díaz-Guerra, M.J., Bermejo, P., Castrillo, A., Boscá L. and Villar, A. (1999) Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF- κ B by andalusol. *Br J Pharmacol Chemother*, 128, 605-612.
16. Martín Panizo, F., Rodríguez, B. and Valverde, S. (1972) Lagascatriol, a new diterpenoid from *Sideritis angustifolia* Lag. (Labiatae). *Anales de Química*, 68, 1463-1465.
17. Martín Panizo, F., Rodríguez, B. and Valverde, S. (1974) Estructura total revisada del lagascatriol, nuevo diterpeno de "*Sideritis angustifolia*" Lag. *Anales de Química*, 70, 164-171
18. von Carstenn-Lichterfelde, C., Valverde, S and Rodríguez, B. (1974) Studies on diterpenes from genus *Sideritis*. XIII two new stachene derivatives from *Sideritis angustifolia* (Labiatae). *Aust J Chem*, 27, 517-529.
19. López, M.A., von Carstenn-Lichterfelde, C and Rodríguez, B. (1977) Andalusol, a new diterpenoid from a *Sideritis arborescens* Salzm. subsp. *Chemical and X-ray structure determination.* *J Org Chem*, 42, 2517.
20. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 65, 55-63.
21. Fenton, H.J.H. (1984) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc*, 65, 899-910.
22. Gershenson, J. and Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the

natural world. *Nat Chem Biol*, 3, 408 - 414.

23. LeBel, CP.; Ischiropoulos, H. and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* , 5, 227-231.
-