

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,
EXACTAS Y TECNOLOGÍAS ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**“ESTUDIO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA DE
COMPUESTOS TERPENOS DERIVADOS DE LA CARVONA EN CÉLULAS
RAW 264.7”**

AUTORA: ANA TERESA GONZÁLEZ ALFONSO

**Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología como
requisito para optar por el título de Licenciada en Biología con
orientación en Fisiología Y Comportamiento Animal.**

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,
EXACTAS Y TECNOLOGÍAS ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**“ESTUDIO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA DE
COMPUESTOS TERPENOS DERIVADOS DE LA CARVONA EN CÉLULAS RAW
264.7”**

Ana Teresa González Alfonso. Tesis Licenciatura. Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito para optar por el título de Licenciada en Biología con orientación en Fisiología Y Comportamiento Animal. Universidad de Panamá, Panamá.

Comité Asesor

Mgr. Gloria de Trujillo. Departamento de Fisiología Y Comportamiento Animal, Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá.

Dra. Ciara Ordoñez. Departamento de Farmacia, Universidad de Panamá. Facultad de Medicina. Investigadora del Centro de Investigación Psicofarmacológico de la Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá.

Prof. Gilberto Becerra. Departamento de Fisiología Y Comportamiento Animal, Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá.



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

*ESTUDIO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA DE COMPUESTOS
TERPENOS DERIVADOS DE LA CARVONA EN CÉLULAS RAW 264.7.*

Por:

ANA TERESA GONZÁLEZ ALFONSO: _____

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología
como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con
orientación en Fisiología y Comportamiento Animal.

Dra. Ciara Ordoñez.

Mgtr. Gloria de Trujillo.

Mgtr. Gilberto Becerra.

Dedico este trabajo a mis padres, por su amor incondicional. A la Dra. Ciara Ordóñez, quien, más que una mentora, fue una madre y amiga. Le agradezco profundamente no solo por su guía académica, sino también por su calidez y apoyo invaluable. A mi amiga de carrera Nicole Samudio, quien me acompañó durante todos los años, siendo una fuente constante de amistad, alegría y apoyo. Al primer amigo que conocí en la facultad, Saúl González, cuya compañía marcó el inicio de esta etapa tan significativa. A todos los amigos que hice en la facultad: Marian Alventas, Idelmaris Obando e Isaid Morales, con quienes compartí momentos clave durante este recorrido. A mi amiga del alma, quien me impulso a terminar esta difícil tarea, con sus consejos y apoyo emocional, Alisson Guerra, Gracias por las risas, el apoyo y las experiencias que hicieron este camino mucho más llevadero.

Con gratitud y amor,

Ana Teresa González Alfonso.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, al Laboratorio CIPFAR (Centro de Investigación Psicofarmacológico de la Universidad de Panamá), por brindarme un espacio donde desarrollar mi trabajo de tesis. Su apoyo y recursos fueron esenciales para alcanzar este objetivo. A la Escuela de Biología, por haber sido el inicio de mi formación académica y personal. Agradezco a los profesores que me acompañaron en este camino, especialmente a aquellos que no solo me enseñaron con dedicación, sino que también me ofrecieron comprensión, motivación y ánimo. Su apoyo incondicional, independientemente de las barreras que pudiera enfrentar, marcó una diferencia significativa en mi desarrollo como bióloga. A la Dra. Yisett González y a la Dra. Ciara Ordóñez, cuyo apoyo y disposición facilitaron mi aprendizaje y mi trabajo. Agradezco también a todo el equipo de INDICASAT, A Dilán Moreno, un compañero de laboratorio excepcional, por su disposición, amabilidad y trabajo en equipo durante todo el proceso. Finalmente, agradezco a SENACYT por el financiamiento que hizo posible la realización de esta tesis, brindándome los recursos necesarios para llevar a cabo mi investigación. A todas las personas que, de una manera u otra, contribuyeron a mi formación y a este proyecto, mi más sincero agradecimiento. Cada uno de ustedes ha sido fundamental en este logro.

Con gratitud,

Ana Teresa González Alfonso.

RESUMEN

La inflamación crónica es un proceso desregulado del sistema inmunológico que desempeña un papel central en el desarrollo de enfermedades como la artritis reumatoide, el cáncer y los trastornos neurodegenerativos. Este estado inflamatorio sostenido, mediado por citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), perpetúa el daño tisular y contribuye a la progresión de estas patologías. La búsqueda de terapias seguras y eficaces ha dirigido la atención hacia compuestos naturales con potencial antiinflamatorio, como los terpenos derivados de la carvona. Este estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antiinflamatoria de carvonas en células macrófagas RAW 264.7 estimuladas con lipopolisacárido (LPS). Se realizarán ensayos de viabilidad celular (MTT) para determinar la toxicidad de las carvonas y establecer la dosis óptima segura. Además, mediante ensayos de ELISA, se cuantificó la producción de TNF- α e IL-6 para analizar el efecto modulador de las carvonas sobre estos mediadores clave. Los resultados preliminares muestran que las carvonas inhiben significativamente la producción de TNF- α e IL-6, preservando la viabilidad celular a concentraciones ≤ 100 μM . Este efecto sugiere un mecanismo de acción antiinflamatorio sin comprometer la integridad celular. Estos hallazgos destacan el potencial de las carvonas como candidatos para el desarrollo de terapias innovadoras frente a enfermedades inflamatorias crónicas, ofreciendo una alternativa más segura a los antiinflamatorios convencionales. Este trabajo refuerza la relevancia de explorar compuestos naturales como una base prometedora para futuras investigaciones y tratamientos personalizados.

ABSTRACT

Chronic inflammation is a dysregulated immune system process that plays a central role in the development of diseases such as rheumatoid arthritis, cancer, and neurodegenerative disorders. This sustained inflammatory state, mediated by cytokines like tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), perpetuates tissue damage and contributes to the progression of these pathologies. The search for safe and effective therapies has directed attention toward natural compounds with anti-inflammatory potential, such as terpenes derived from carvone. This study aims to evaluate the anti-inflammatory activity of carvones in RAW 264.7 macrophage cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). MTT cell viability assays will be performed to determine carvone toxicity and establish the optimal safe dose. Additionally, ELISA assays will quantify TNF- α and IL-6 production to analyze the modulatory effect of carvones on these key inflammatory mediators. Previous results show that carvones significantly inhibit TNF- α and IL-6 production while preserving cell viability at concentrations ≤ 100 μ M. This effect suggests a potential anti-inflammatory mechanism without compromising cellular integrity. These findings highlight the potential of carvones as candidates for developing innovative therapies against chronic inflammatory diseases, offering a safer alternative to conventional anti-inflammatory drugs. This work underscores the importance of exploring natural compounds as a promising foundation for future research and personalized treatment approaches.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Antecedentes	12
1.2 Planteamiento del Problema	14
1.4 Objetivos.....	15
1.5 Hipótesis.....	16
II. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Introducción a la Inflamación.....	18
2.1.1. Historia y evolución del concepto	18
2.1.2. La inflamación en la medicina moderna	19
2.1.3. Fisiología de la Inflamación	21
2.1.4. Tipos de Inflamación: Aguda y Crónica.....	21
2.1.5. Regulación y Resolución del Proceso Inflamatorio.....	22
2.2. Impacto de la Inflamación en la Homeostasis del Organismo.....	24
2.2.1. Sistema Cardiovascular	24
2.2.2. Sistema Metabólico (Metainflamación).....	24
2.2.3. Sistema Nervioso Central (Neuroinflamación y Alzheimer)	25
2.3. Componentes Celulares y Modelos Experimentales	25
2.3.1. Células del Sistema Inmunitario en la Inflamación	25
2.4. Línea Celular RAW 264.7: Un Modelo <i>In Vitro</i> para el Estudio de la Inflamación.....	27
2.5. Importancia de los Modelos Experimentales en la Investigación de la Inflamación....	28
2.5.1. Modelos <i>in vitro</i>	28
2.5.2. Modelos <i>in vivo</i>	29
2.6. Mediadores de la Inflamación y Vías de Señalización	30
2.6.1. Mediadores Químicos de la Inflamación	30
2.6.2. Vías de Señalización en la Inflamación	31
2.6.3. Mecanismos de activación: NF- κ B, MAPK y TLR4	32
2.6.4. Regulación de la respuesta inflamatoria: control de TNF- α , IL-6 y prostaglandinas	32
2.6.5. Estrategias Terapéuticas y Regulación de la Inflamación	33
2.7. Compuestos Antiinflamatorios y Modulación de la Inflamación	34
2.7.1. Carvona y terpenos como reguladores de vías inflamatorias.....	34
2.8. Inflamación y Enfermedades Crónicas	36
2.8.1. Inflamación crónica y enfermedades autoinmunes	36

2.8.2. Inflamación y enfermedades cardiovasculares.....	37
2.8.3. Inflamación y enfermedades metabólicas.....	38
2.8.4. Neuro inflamación y enfermedades neurodegenerativas	39
2.8.5. Inflamación crónica y cáncer	41
2.9. Técnicas Experimentales en la Investigación de la Inflamación	43
2.9.1. Ensayos de Viabilidad Celular y Evaluación de Toxicidad	43
2.9.2. Metodologías Clave en Ensayos de Viabilidad y Toxicidad.....	43
2.9.3. Importancia y Aplicaciones.....	44
2.9.4. Cuantificación de Mediadores Inflamatorios: ELISA y qPCR	44
2.9.5. qPCR: Cuantificación de la Expresión Génica Inflamatoria	45
2.9.6 Modelos Experimentales de Inflamación: <i>In Vitro</i> vs. <i>In Vivo</i>	46
2.10. Aplicaciones de la Investigación en Inflamación	48
2.11. Importancia Continua de la investigación en Inflamación.....	50
III. MATERIALES Y METODOS	51
3.1. Obtención de derivados de R-(-)- y S-(+)-carvona.....	52
3.1.1. Síntesis General	52
3.1.2. Caracterización.....	52
3.1.3. Catálisis con hidrotalcita.....	53
3.2. Síntesis de epóxidos derivados de la 7,8-carvona.	54
3.2.1. Bromoésteres.	54
3.3. Reactivos y Medios de Cultivo	56
3.3.1. Reactivos y sustancias biológicas	56
3.3.2. Medios de Cultivo:.....	56
3.4. Equipos y Software	57
3.4.1. Equipos	57
3.4.2 Software	57
3.5. Línea Celular Utilizada	58
3.6. Preparación de los Ensayos Condiciones de Cultivo Celular	58
3.6.1 Tratamientos con Carvona y LPS.....	59
3.7. Métodos Experimentales	59
3.7.1. Conteo celular	59
3.8. Ensayo de Viabilidad Celular (MTT):.....	62
3.9. Cuantificación de Citoquinas (ELISA)	63
3.10. Método Estadístico	63
IV. RESULTADOS.....	64
4.1. Obtención de derivados de R-(-)- y S-(+)-carvona.....	65

4.2. Síntesis diastereoselectiva de epóxidos derivados de la 7,8-carvona.....	65
4.2.1. Bromoésteres	65
4.3. Selección de concentraciones de análogos de carvona para evaluar actividad antiinflamatoria en macrófagos RAW 264.7.....	68
4.4. Análisis del efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a una concentración de 665 μ M.	69
4.5. Análisis del efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a una concentración de 66.5 μ M.	71
4.6. Efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a concentraciones de (1, 3, 10, 30 y 100 μ M).	73
4.7. Efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a concentraciones de (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μ M).....	75
4.8. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de TNF en RAW 264.7.	78
4.9. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de IL-6 en macrófagos RAW 264.7	80
4.10. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de TNF-alfa en macrófagos RAW 264.7.	82
4.11. Evaluación de la concentración inhibitoria 50 (IC50).	84
IV. DISCUSIÓN	88
Mecanismo de Acción (Hipótesis).....	99
Estructura y Composición	110
VI. CONCLUSIONES	114
VII. RECOMENDACIONES	116
VII. BIBLIOGRAFIA.....	118

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La inflamación constituye una respuesta biológica esencial del sistema inmunológico ante estímulos nocivos como infecciones, lesiones o toxinas. Este proceso fisiológico tiene como finalidad la eliminación de agentes patógenos, la reparación tisular y la restauración de la homeostasis. No obstante, cuando la inflamación se vuelve persistente o se desregula, puede convertirse en un factor patológico central en el desarrollo y progresión de múltiples enfermedades crónicas, entre ellas artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos neurodegenerativos (National Cancer Institute, 2015). Desde una perspectiva fisiológica, la inflamación se clasifica en dos tipos principales: aguda y crónica. La inflamación aguda se manifiesta como una respuesta rápida y transitoria, caracterizada por vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y migración de leucocitos al sitio de la lesión, mediada principalmente por células del sistema inmune innato. Por el contrario, la inflamación crónica implica la activación sostenida de células como macrófagos y linfocitos, generando un proceso prolongado de daño tisular y disfunción orgánica (Kindt et al., 2007). Los macrófagos desempeñan un papel crucial en la orquestación de la respuesta inflamatoria. Estas células fagocíticas no solo eliminan patógenos y restos celulares, sino que también secretan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), que amplifican la respuesta inmune e inducen el reclutamiento de otras células del sistema inmunitario. Adicionalmente, los macrófagos pueden polarizarse hacia fenotipos funcionales distintos: M1 (proinflamatorios) o M2 (antiinflamatorios), en respuesta al microambiente, lo que los convierte en reguladores dinámicos del equilibrio inflamatorio (Facchin et al., 2022).

Entre los mediadores de inflamación más relevantes, el TNF- α promueve vasodilatación y permeabilidad vascular mediante la inducción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas, mientras que la IL-6 actúa de forma sistémica y es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandina E2 en el hipotálamo. Aunque estas funciones son esenciales para la defensa del organismo, su exceso o desregulación puede causar inflamación sostenida y daño tisular, como ocurre en patologías autoinmunes y crónicas (Campos et al., 2021). Para el estudio experimental de la inflamación, la línea celular RAW 264.7, derivada de macrófagos murinos, constituye un modelo ampliamente utilizado. Estas células, al ser estimuladas con lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas, reproducen eficientemente el entorno inflamatorio al secretar grandes cantidades de TNF- α e IL-6, lo que las convierte en una plataforma ideal para la evaluación de agentes antiinflamatorios in vitro (Facchin et al., 2022). El creciente interés por compuestos bioactivos de origen natural ha llevado a investigar los terpenos, metabolitos secundarios presentes en aceites esenciales, reconocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Benabed et al., 2013). Dentro de este grupo, la carvona, un monoterpeno derivado de plantas como la menta o el comino, ha demostrado capacidad para modular vías inflamatorias, como NF- κ B, reduciendo la síntesis de TNF- α e IL-6 sin comprometer la viabilidad celular (Gollither et al., 2021). Debido a estos efectos promisorios, la carvona y sus derivados se perfilan como posibles alternativas terapéuticas con mejor perfil de seguridad que los tratamientos antiinflamatorios convencionales, frecuentemente asociados a efectos adversos tras su uso prolongado. En este marco, se justifica la

evaluación científica de estos compuestos en modelos celulares, con el fin de profundizar en sus mecanismos de acción y validar su potencial antiinflamatorio.

1.2 Planteamiento del Problema

A pesar de la amplia disponibilidad y los avances en terapias antiinflamatorias convencionales, como los AINEs y los corticosteroides, estas opciones presentan efectos adversos significativos, limitaciones terapéuticas y, en muchos casos, escasa efectividad frente a procesos inflamatorios crónicos, especialmente tras un uso prolongado. Esto ha generado una necesidad crítica y no resuelta de desarrollar nuevas terapias con potente acción antiinflamatoria y un perfil de seguridad mejorado. La investigación biomédica se ha enfocado en la búsqueda de compuestos naturales o semisintéticos con propiedades inmunomoduladoras y bajo nivel de toxicidad. Entre ellos, los monoterpenos derivados de la carvona han mostrado actividad antioxidante; sin embargo, aún se desconoce si pueden reducir la producción de citoquinas proinflamatorias sin comprometer la viabilidad celular. Esta laguna en el conocimiento limita la valoración de su verdadero potencial terapéutico.

Por lo tanto, se plantea la necesidad de evaluar, en un modelo in vitro, tanto su capacidad antiinflamatoria como su perfil de seguridad. De esta manera, surge la pregunta de investigación:

¿Qué efecto tienen los monoterpenos derivados de la carvona sobre la viabilidad celular y la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) en macrófagos RAW 264?7 estimulados con LPS, en un modelo in vitro de inflamación inducida por LPS?

1.3 Justificación

Este estudio busca contribuir al desarrollo de nuevas terapias basadas en compuestos naturales con capacidad para modular la respuesta inflamatoria. La validación de la actividad antiinflamatoria de terpenos derivados de la Carvona en modelos celulares puede sentar las bases para futuras aplicaciones en enfermedades crónicas donde la inflamación juega un papel central.

Nos permite comprender su mecanismo de acción permitirá un avance significativo en el diseño racional de fármacos con mejor perfil de seguridad y eficacia. Esta investigación también fortalece la producción científica nacional y la formación académica en biomedicina experimental.

1.4 Objetivos

Objetivo General

Evaluar in vitro el efecto antiinflamatorio de monoterpenos derivados de la Carvona sobre la producción de TNF- α e IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a diferentes concentraciones de monoterpenos derivados de la Carvona.
2. Cuantificar la producción de TNF- α e IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y tratadas con los compuestos.
3. Determinar la concentración máxima no citotóxica (CMNC) de los terpenos seleccionados.

4. Analizar el perfil antiinflamatorio de los compuestos en función de la inhibición de citoquinas sin afectar la viabilidad celular.

1.5 Hipótesis

Hipótesis Nula (H_0):

Los monoterpenos derivados de la Carvona no tienen efecto sobre la viabilidad celular ni inhiben la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Hipótesis Alternativa (H_1):

Los monoterpenos derivados de la Carvona reducen la producción de TNF- α e IL-6 sin afectar la viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, evidenciando un efecto antiinflamatorio.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Introducción a la Inflamación

La Inflamación es un proceso biológico fundamental que ha sido objeto de estudio desde los inicios de la medicina. Su comprensión ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde descripciones empíricas hasta modelos científicos avanzados que explican su complejidad molecular. A lo largo de la historia, la inflamación ha sido reconocida como una respuesta esencial del organismo frente a lesiones e infecciones, y su estudio ha permitido desarrollar estrategias terapéuticas clave en la medicina moderna.

2.1.1. Historia y evolución del concepto

Las primeras referencias documentadas sobre la inflamación provienen del Antiguo Egipto, en los papiros de Edwin Smith (siglo XVII aC), donde se describen signos de inflamación en el contexto de heridas traumáticas. Sin embargo, fue en la Grecia clásica cuando se establecieron los primeros criterios médicos sobre este fenómeno. Hipócrates (460-370 aC) y posteriormente Aulo Cornelio Celso (25 aC-50 dC) describieron los cuatro signos cardinales de la inflamación: *rubor* (enrojecimiento), *calor* (aumento de temperatura), *tumor* (hinchazón) y *dolor* (sensación dolorosa). Más adelante, en el siglo XIX, el patólogo Rudolf Virchow añadió un quinto signo clínico, *functio laesa* (pérdida de función), consolidando la visión clínica de la lesión como un proceso fisiopatológico común a muchas enfermedades (Cavaillon, 2021).

Durante la Edad Media, médicos islámicos como Avicena ampliaron la descripción de la inflamación y sus manifestaciones clínicas, integrando observaciones empíricas con teorías filosóficas sobre la enfermedad. No obstante, la verdadera transformación del concepto ocurrió en la era moderna con el desarrollo de la teoría celular en el siglo XIX. Rudolf Virchow postuló que la inflamación no era simplemente un síntoma de enfermedad, sino una respuesta celular activa ante agresiones externas e internas. Este hallazgo permitió vincular la inflamación con la patogénesis de diversas enfermedades y abrió el camino a nuevas estrategias terapéuticas.

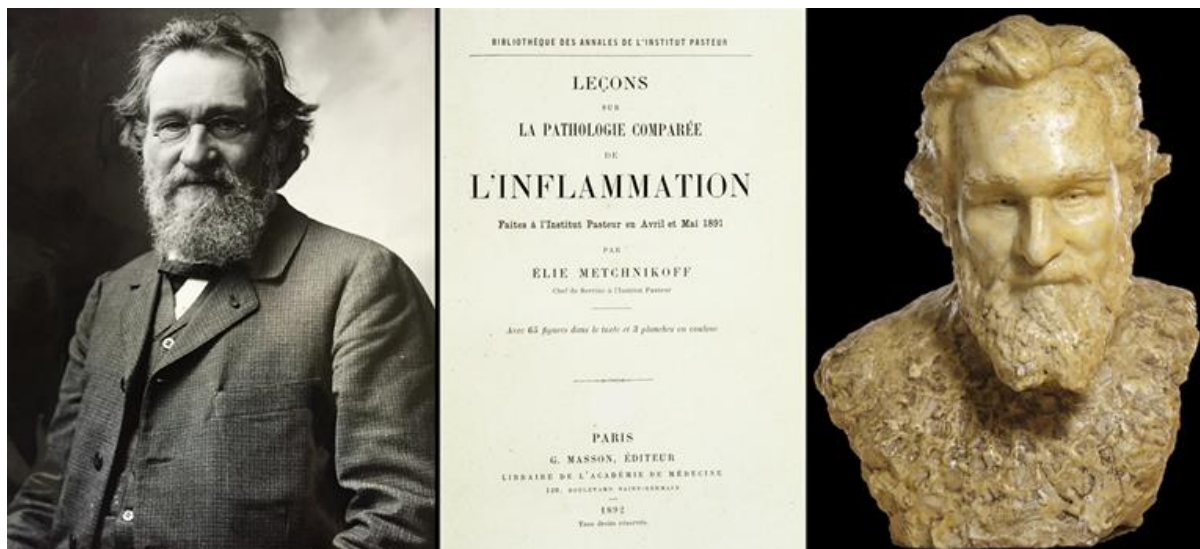


Figura 1. Representación de Élie Metchnikoff (1845-1916), con elementos representativos de su trabajo: fotografía (Nadar, 1905), portada de sus lecciones en el Instituto Pasteur y escultura de Olga Metchnikoff. Fuente: Institut Pasteur/Musée Pasteur. Adaptado de: Cavalion, J. L. (2021). Once upon a time, inflammation. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27, e20200147.

2.1.2. La inflamación en la medicina moderna

El siglo XX trajo consigo avances significativos en la comprensión de la inflamación, impulsados por el desarrollo de la biología molecular y la inmunología. En la década de 1950, se identifican los primeros mediadores químicos de la inflamación, como las prostaglandinas y la histamina, los cuales regulan la permeabilidad vascular y el reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación (Nathan, 2002). Posteriormente, se descubrieron las citocinas, proteínas clave en la comunicación celular durante la inflamación, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-10). El descubrimiento de las **citocinas** representó un avance crucial en la comprensión de la inflamación, revelando la sofisticada red de comunicación celular que orchestra esta compleja respuesta biológica. Inicialmente, se pensaba que la inflamación era principalmente una respuesta local a la lesión o infección. Sin embargo, el hallazgo de estas proteínas secretadas demostró que las células inmunitarias y otros tipos celulares involucrados en la inflamación se comunican entre sí a través de señales químicas, coordinando sus acciones tanto a nivel local como sistémico.

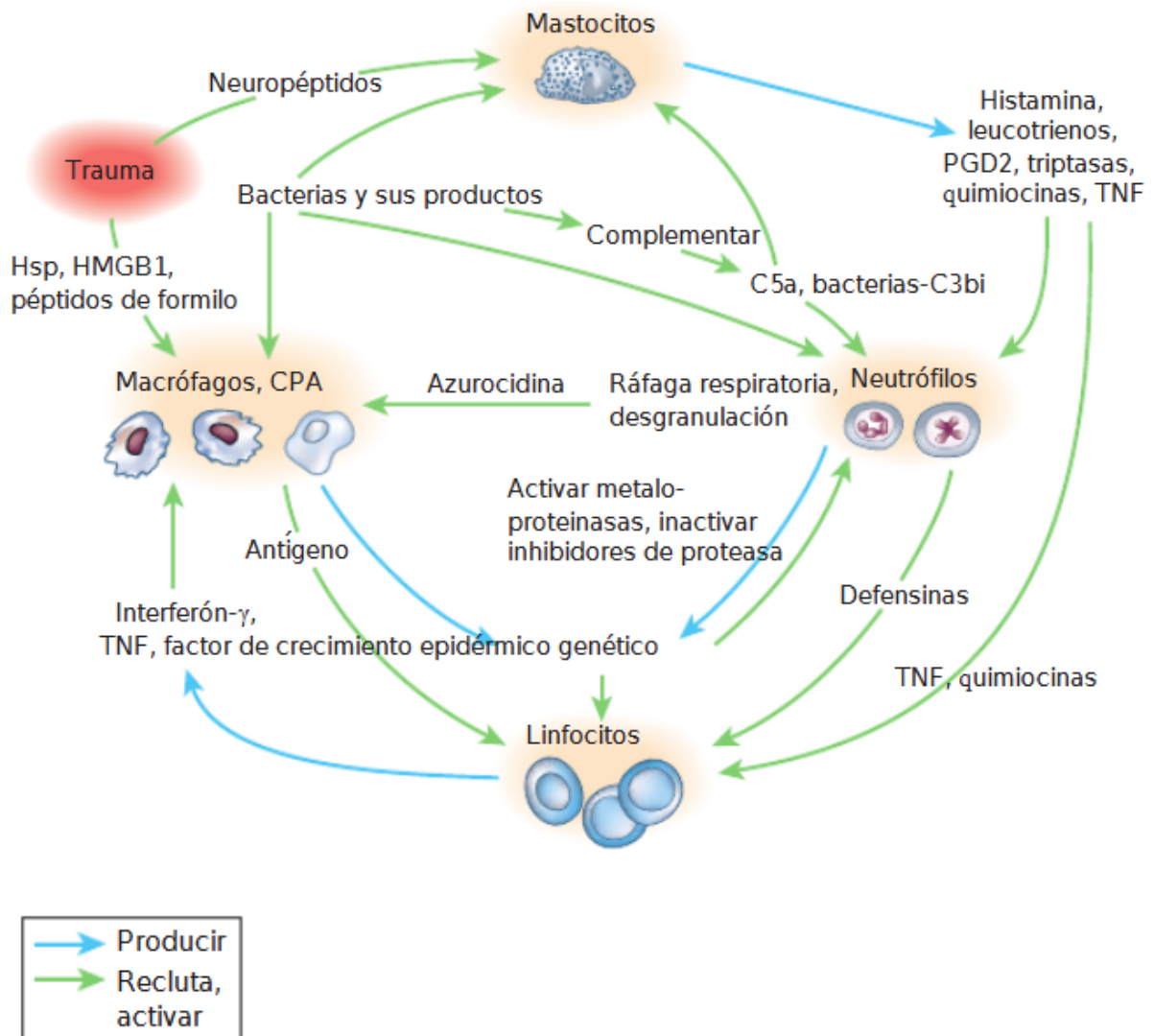


Figura 2. Evolución del concepto de inflamación: Ilustra el flujo de información en las etapas iniciales de la inflamación tras un traumatismo leve con infección. Se muestra cómo diferentes tipos de células y moléculas interactúan y se activan mutuamente para amplificar la respuesta inflamatoria. Adaptada de Nathan (2002),

Los avances tecnológicos en las últimas décadas han permitido identificar vías de señalización específicas involucradas en la inflamación, tales como la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB), la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y los receptores tipo Toll (TLRs), que desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008). El reconocimiento de estos mecanismos ha sido crucial para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios dirigidos a bloquear la señalización de citocinas proinflamatorias y reducir el daño tisular asociado a la inflamación crónica. Hoy en día, la inflamación

es reconocida no sólo como una respuesta protectora del organismo, sino también como un factor clave en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas. Cuando la activación del sistema inmunológico se prolonga, contribuye al daño tisular progresivo y al deterioro funcional de los órganos afectados (Tizard, 2018). En este contexto, la investigación contemporánea se enfoca en el desarrollo de terapias personalizadas y estrategias de modulación de la inflamación, con el objetivo de reducir sus efectos nocivos sin comprometer la función del sistema inmunológico. Entre las estrategias emergentes, se ha explorado el uso de compuestos naturales con actividad antiinflamatoria, como los terpenos y, en particular, la carvona, un monoterpeno con potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias.

2.1.3. Fisiología de la Inflamación

La inflamación constituye una respuesta biológica esencial que permite al organismo enfrentar agresiones tanto externas como internas, facilitando la reparación tisular y la defensa frente a infecciones. En este sentido, se pueden distinguir dos tipos principales de inflamación: aguda y crónica, cada una con características, mecanismos y consecuencias fisiopatológicas particulares.

2.1.4. Tipos de Inflamación: Aguda y Crónica

La inflamación aguda es una respuesta esencial del sistema inmunitario innato, inmediata e inespecífica, desencadenada por estímulos lesivos, ya sean infecciosos o no infecciosos, manifestándose a través de los cinco signos cardinales: calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de función, resultantes del aumento del flujo sanguíneo y la acumulación de líquido en el área afectada; se inicia tras una lesión específica, liberando mediadores solubles como citocinas, proteínas de fase aguda y quimiocinas, que promueven la migración de neutrófilos y macrófagos al sitio de la inflamación, con contribuciones de monocitos y mastocitos; mecanismos clave incluyen la activación de Receptores tipo Toll (TLR) por patrones moleculares (PAMPs o DAMPs), el metabolismo de mediadores del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), la liberación de mediadores por mastocitos, la activación del sistema del complemento y el factor de Hageman; otros mediadores incluyen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda, factores de crecimiento y factores de transcripción; la vía inflamatoria involucra inductores (exógenos y endógenos),

sensores, mediadores y efectores, buscando restablecer la homeostasis; en condiciones adecuadas, la inflamación aguda se resuelve espontáneamente, pero puede progresar a inflamación subaguda (2 a 6 semanas) y crónica (más de 6 semanas), marcada por la migración de linfocitos T y células plasmáticas, llevando a daño tisular y fibrosis.(Hannoodee & Nasuruddin, 2020).

La inflamación crónica, también conocida como inflamación lenta y prolongada, comparte algunas características iniciales con la fase aguda, como la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo, pero se distingue por un cambio en la composición celular del infiltrado. En esta etapa, los neutrófilos son reemplazados progresivamente por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, las cuales liberan citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y enzimas que, en conjunto, contribuyen tanto a la persistencia del daño tisular como a los procesos de reparación secundaria, tales como la formación de fibrosis y granulomas. A diferencia de la inflamación aguda, que es una respuesta rápida y autolimitada, la inflamación crónica persiste durante meses o años y puede surgir por diversas causas, incluyendo la persistencia de agentes infecciosos (como *Mycobacterium tuberculosis*), la exposición prolongada a irritantes (como el polvo de sílice), trastornos autoinmunes (como la artritis reumatoide) o defectos en la regulación de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta prolongada y desregulada se asocia con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas, incluyendo condiciones autoinmunes, cardiovasculares, metabólicas y neurodegenerativas. Además, la inflamación crónica puede llevar a un aumento del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, contribuyendo aún más al daño tisular. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a las enfermedades crónicas como la mayor amenaza para la salud humana, y se prevé que su prevalencia aumente en las próximas décadas. (Pahwa, Goyal, & Jialal, 2023).

2.1.5. Regulación y Resolución del Proceso Inflamatorio

La inflamación, pese a ser un mecanismo de defensa vital, puede resultar perjudicial si no se regula adecuadamente, puesto que el equilibrio entre la activación inflamatoria y los mecanismos de resolución es esencial para evitar daños colaterales en los tejidos sanos y mantener la homeostasis. Este proceso se inicia cuando los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los

Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs) y C-type lectin receptors (CLRs), detectan patógenos (PAMPs) o señales de daño (DAMPs), lo que desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Para prevenir un daño excesivo, el organismo activa mecanismos de control endógenos y procesos activos de resolución que se pueden resumir en tres estrategias fundamentales: A) la apoptosis de neutrófilos y su posterior eferocitosis, permitiendo la eliminación controlada de las células inflamatorias por parte de los macrófagos; B) la liberación de mediadores pro-resolutivos, como las lipoxinas, resolvinas, maresinas y protectinas, que facilitan la transición hacia la fase resolutoria; y C) la reprogramación de macrófagos, en la que se produce la conversión del fenotipo M1 (proinflamatorio) al M2 (antiinflamatorio y reparador), esencial para la restauración del tejido dañado. La resolución inflamatoria también implica la eliminación de patógenos, detritos proinflamatorios y citocinas, así como la restauración de la arquitectura y función tisular, incluyendo la revascularización, donde mediadores como la prostaglandina E2 (PGE2), ácidos grasos omega-3, anexina A1, IL-10 y TGF β juegan roles importantes. Cuando estos mecanismos fallan—debido a la persistencia del agente inflamatorio, la desregulación de citocinas o la disfunción en los procesos de apoptosis y eferocitosis—la resolución del proceso inflamatorio no se completa, perpetuando la respuesta inflamatoria y favoreciendo el desarrollo de condiciones crónicas. La inflamación crónica, asociada a enfermedades como la aterosclerosis, diabetes tipo 2 y Alzheimer, se caracteriza por una respuesta inflamatoria no resuelta que contribuye al daño tisular progresivo. A diferencia de las enfermedades autoinmunes, donde el desencadenante inflamatorio es una cascada autoinmune, estas enfermedades crónicas son impulsadas por estímulos persistentes que generan DAMPs, activando PRRs y perpetuando la inflamación. El desafío en el tratamiento de la inflamación crónica radica en la redundancia de las vías inflamatorias, la compensación de mecanismos y la necesidad de mantener la respuesta inmune para la defensa del huésped. Sin embargo, el avance en la comprensión de las vías de señalización inflamatoria y los mecanismos de resolución, junto con el desarrollo de nuevos fármacos, ofrece perspectivas prometedoras para la investigación traslacional (Tabas & Glass, 2013).

2.2. Impacto de la Inflamación en la Homeostasis del Organismo

La inflamación, un proceso biológico finamente orquestado, trasciende su función primordial de defensa contra agentes patógenos, emergiendo como un regulador crucial de la homeostasis sistémica. No cuando este mecanismo se desregula, se convierte en un actor protagónico en la génesis de una variedad de afecciones patológicas que comprometen la integridad de múltiples sistemas orgánicos.

2.2.1. Sistema Cardiovascular: En el sistema cardiovascular, la inflamación crónica se erige como un pilar fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis, una enfermedad insidiosa caracterizada por la acumulación de placas ateromatosas en las paredes arteriales. La activación persistente de macrófagos y linfocitos, orquestada por mediadores inflamatorios, facilita la formación y progresión de estas placas, comprometiendo la luz vascular y predisponiendo a eventos trombóticos devastadores. La disfunción endotelial, inducida por la cascada inflamatoria, exacerba aún más este proceso, creando un microambiente procoagulante que incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares agudos. La inflamación, por lo tanto, se revela como un nexo crítico que conecta factores de riesgo tanto tradicionales, como la hiperlipidemia, como emergentes, como la hematopoyesis clonal, con la desestabilización de la homeostasis cardiovascular. La evidencia clínica respalda la eficacia de las terapias antiinflamatorias en la mitigación de eventos cardiovasculares, subrayando la relevancia de la inflamación como un objetivo terapéutico para restaurar la homeostasis clínica (Libby, 2021).

2.2.2. Sistema Metabólico (Metainflamación): En el sistema metabólico, la inflamación crónica de bajo grado, también conocida como "metainflamación", emerge como un actor central en la génesis de la obesidad y la resistencia a la insulina. Este proceso se caracteriza por la activación crónica de macrófagos en el tejido adiposo, un órgano endocrino multifuncional, y la consiguiente liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, que interfieren con la señalización de la insulina a nivel celular. El tejido adiposo, un reservorio energético y un sitio clave para la interacción entre adipocitos y células inmunitarias, se convierte en un foco de inflamación crónica, donde la infiltración de macrófagos y otras células inmunitarias es una característica distintiva. La activación de quinasas inflamatorias como JNK, IKK y PKC, desencadenada por citocinas, ácidos grasos libres y estrés

del retículo endoplásmico, converge en la fosforilación de serina de IRS-1, un sustrato del receptor de insulina, inhibiendo la acción de la insulina y perpetuando la resistencia a la insulina. (Hotamisligil, 2006).

2.2.3. Sistema Nervioso Central (Neuroinflamación y Alzheimer): En el sistema nervioso central, la neuroinflamación se erige como un factor etiológico clave en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA), una enfermedad neurodegenerativa devastadora. La activación de la microglía, las células inmunitarias residentes del cerebro, por oligómeros solubles y fibrillas de amiloide β ($A\beta$) a través de receptores como TLRs, desencadena una cascada de eventos inflamatorios que culminan en la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estas citocinas, a su vez, contribuyen a la neurodegeneración, perpetuando un ciclo vicioso de inflamación y daño neuronal. La activación del inflamasoma NLRP3 por fibrillas de $A\beta$ y la activación del sistema del complemento también juegan un papel crítico en la amplificación de la neuroinflamación en la EA, exacerbando el daño neuronal y la disfunción cognitiva. (Heneka et al., 2015).

2.3. Componentes Celulares y Modelos Experimentales

El proceso inflamatorio es una respuesta intrincada y finamente regulada que involucra la participación coordinada de una variedad de células del sistema inmunitario, abarcando tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Estas células desempeñan roles multifacéticos que son esenciales para la detección del agente agresor, la amplificación de la respuesta inflamatoria y el restablecimiento de la homeostasis tisular.

2.3.1. Células del Sistema Inmunitario en la Inflamación

El proceso inflamatorio es una respuesta intrincada y finamente regulada que involucra la participación coordinada de una variedad de células del sistema inmunitario, abarcando tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Estas células desempeñan roles multifacéticos que son esenciales para la detección del agente agresor, la amplificación de la respuesta inflamatoria y el restablecimiento de la homeostasis tisular.

2.3.1.1. Neutrófilos

En la fase aguda de la inflamación, los neutrófilos emergen como los primeros respondedores, migrando rápidamente al sitio de la lesión en respuesta a una cascada de señales quimiotácticas, incluyendo la interleucina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Su función primordial radica en la fagocitosis de patógenos y restos celulares, así como en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas hidrolíticas, que en conjunto contribuyen a la erradicación del agente agresor. Sin embargo, es crucial destacar que su activación desmedida puede acarrear daños colaterales en los tejidos circundantes, exacerbando así la respuesta inflamatoria. Como se ilustra en la Figura 1, los neutrófilos responden a señales como "C5a, bacteria-C3bi" y participan en procesos como "Respiratory burst, degranulation" (Nathan, 2002).

2.3.1.2. Macrófagos (Fenotipos M1 y M2)

A medida que la inflamación progresa, los macrófagos entran en escena, exhibiendo plasticidad y desempeñándose como moduladores en la respuesta inflamatoria; ellas pueden derivar de monocitos circulantes que se infiltran en los tejidos inflamados o persisten como macrófagos residentes. En la etapa inicial de la inflamación, los macrófagos muestran fenotipo M1 (proinflamatorio), caracterizado por la liberación de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como óxido nítrico y otras moléculas antimicrobianas. Este perfil es esencial para intensificar la inflamación y eliminar la amenaza. No obstante, en la fase de resolución, los macrófagos pueden transitar hacia un fenotipo M2 (antiinflamatorio y reparador), promoviendo la liberación de IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), lo que facilita la regeneración tisular y la resolución del proceso inflamatorio (Abbas, Lichtman & Pillai, 2018).

2.3.1.3. Mastocitos

Además, los neutrófilos y macrófagos, los mastocitos también desempeñan un papel importante en la inflamación. Estas células, residentes en los tejidos, liberan histamina, serotonina y otras aminas vasoactivas en respuesta a estímulos proinflamatorios. Su activación contribuye a la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de leucocitos al sitio inflamado. Como se

observa en la Figura 1, los mastocitos liberan "Histamine, leukotrienes, PGD2, tryptases, chemokines, TNF" (Nathan, 2002).

2.3.1.4. Linfocitos

En la inflamación crónica, las células de respuesta adaptativa, los linfocitos T y B, asumen su rol en la amplificación y persistencia del proceso inflamatorio. Los linfocitos T CD4+, a través de sus subpoblaciones Th1 y Th17, fomentan la inflamación mediante la producción de interferón gamma (IFN- γ) e IL-17, mientras que los linfocitos T reguladores (Treg) pueden mitigar la respuesta inflamatoria para prevenir daños tisulares excesivos (Kumar, Abbas & Aster, 2021).

2.4. Línea Celular RAW 264.7: Un Modelo *In Vitro* para el Estudio de la Inflamación

Los modelos experimentales *in vitro* han sido fundamentales para desentrañar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la inflamación. Entre ellos, la línea celular RAW 264.7, derivada de macrófagos murinos, se ha consolidado como una herramienta versátil y ampliamente utilizada para investigar la respuesta inflamatoria. Esta línea celular, obtenida a partir de un tumor inducido por virus en ratones BALB/c, conserva muchas de las características funcionales de los macrófagos primarios, lo que la convierte en un modelo valioso para estudiar la activación de macrófagos y la producción de mediadores inflamatorios (Mosser & Edwards, 2008).

La capacidad de RAW 264.7 para expresar receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como TLR4 (receptor tipo Toll 4) le permite responder a una amplia gama de estímulos proinflamatorios, incluyendo el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas que activa potentemente el sistema inmunitario innato (Medzhitov, 2008). La estimulación de RAW 264.7 con LPS desencadena una cascada de señalización intracelular, que incluye la activación de la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B), una ruta crítica en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios. NF- κ B controla la transcripción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , así como de enzimas como COX-2 e iNOS, que desempeñan un papel central en la amplificación de la respuesta inflamatoria (O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010)).

Además de la vía de NF- κ B, RAW 264.7 permite investigar la activación de otras rutas de señalización inflamatoria, como las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), que regulan la producción de citocinas y la expresión de genes implicados en la inflamación crónica (Takeuchi & Akira, 2010). La versatilidad de RAW 264.7 se extiende más allá de la respuesta a LPS. Esta línea celular puede ser activada por una variedad de otros estímulos proinflamatorios, como lipoproteínas, oligonucleótidos CpG y urato monosódico, lo que amplía su utilidad en el estudio de diferentes aspectos de la inflamación (Piccinini & Midwood, 2010). Además, las modificaciones genéticas de RAW 264.7, como la expresión o el silenciamiento de genes específicos, permiten investigar el papel de moléculas individuales en la respuesta inflamatoria (Murray & Wynn, 2011).

A pesar de sus ventajas, es fundamental reconocer que RAW 264.7 es una línea celular derivada de un modelo tumoral, lo que puede introducir diferencias en comparación con los macrófagos primarios. Por lo tanto, los resultados obtenidos en estudios *in vitro* deben ser validados mediante modelos animales o estudios en células primarias. No obstante, la facilidad de cultivo, la rápida respuesta inflamatoria y la reproducibilidad de RAW 264.7 la convierten en una herramienta valiosa en la investigación de la inflamación y en la evaluación de compuestos con potencial terapéutico.

2.5. Importancia de los Modelos Experimentales en la Investigación de la Inflamación

La inflamación es un proceso fisiológico complejo que involucra una cascada de eventos moleculares y celulares altamente regulados. Su estudio exhaustivo requiere la utilización de modelos experimentales que permitan desentrañar los mecanismos subyacentes y desarrollar estrategias terapéuticas eficaces.

2.5.1. Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro*, como la línea celular RAW 264.7 y las células primarias obtenidas de médula ósea o tejidos inflamados, ofrecen la ventaja de controlar variables y estudiar la respuesta inflamatoria en condiciones simplificadas. La línea RAW 264.7, como se describió anteriormente, es particularmente útil para investigar la activación de macrófagos y la producción de mediadores inflamatorios

en respuesta a estímulos como LPS (Medzhitov, 2008). Las células primarias, por su parte, permiten estudiar la respuesta inflamatoria en condiciones más cercanas a la fisiología normal, aunque su obtención y mantenimiento pueden ser más complejos. Sin embargo, los modelos *in vitro*, aunque valiosos, no siempre reflejan completamente la complejidad de la inflamación en organismos vivos, donde interactúan múltiples sistemas y tejidos (Takeuchi & Akira, 2010).

2.5.2. Modelos *in vivo*

Para superar esta limitación, los modelos animales han sido fundamentales en la investigación de la inflamación, permitiendo evaluar la respuesta inflamatoria en un contexto sistémico. Modelos de inflamación aguda inducida por LPS en ratones, por ejemplo, han sido ampliamente utilizados para estudiar la sepsis y la inflamación sistémica, proporcionando información clave sobre los mecanismos de progresión de enfermedades inflamatorias (Tracey, 2002). Estos modelos permiten analizar la interacción entre el sistema inmunológico, el endotelio vascular y otros órganos, lo que es crucial para comprender la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas. Asimismo, los modelos de artritis inducida en roedores han sido esenciales para el desarrollo y la prueba de terapias dirigidas a enfermedades autoinmunes, permitiendo evaluar la eficacia y seguridad de nuevos fármacos en un contexto fisiológico relevante (Firestein, 2003).

La combinación estratégica de modelos *in vitro* y modelos animales sigue siendo la estrategia más efectiva para comprender la inflamación en su totalidad y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para su control. Los modelos *in vitro* permiten identificar dianas moleculares y evaluar la actividad de compuestos antiinflamatorios, mientras que los modelos animales permiten validar estos hallazgos en un contexto sistémico y evaluar la eficacia y seguridad de nuevas terapias. Además, el desarrollo de modelos más complejos, como los organoides y los modelos de pez cebra, ofrece nuevas oportunidades para estudiar la inflamación en un contexto más fisiológico y visualizar la respuesta inflamatoria en tiempo real (Clevers, 2016).

2.6. Mediadores de la Inflamación y Vías de Señalización

Están involucrados en la inflamación una variedad de mediadores químicos y vías de señalización. Estos componentes trabajan en conjunto para montar una respuesta inflamatoria efectiva, promover la curación de tejidos y restaurar la homeostasis. Sin embargo, la desregulación de estos mediadores y vías puede contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, como la aterosclerosis, la artritis reumatoide y la enfermedad de Alzheimer (Libby, 2021; Firestein, 2003; Heneka et al., 2015).

2.6.1. Mediadores Químicos de la Inflamación

La respuesta inflamatoria está orquestada por una red compleja de mediadores químicos que regulan cada fase del proceso. Estos mediadores incluyen citocinas, quimiocinas, eicosanoides, aminas vasoactivas y componentes del sistema del complemento. Su función principal es modular la activación de las células inmunitarias, facilitar la eliminación del agente causal y promover la resolución de la inflamación. No obstante, un desequilibrio en la producción de estos mediadores puede resultar en inflamación crónica y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β) y la interleucina 6 (IL-6), juegan un papel crucial en la amplificación de la inflamación. TNF- α , producido principalmente por macrófagos y linfocitos T activados, estimula la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, facilitando el reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación. Además, TNF- α induce la producción de citocinas proinflamatorias y activa la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un regulador de la inflamación (Medzhitov, 2008). IL-1 β , por su parte, contribuye a la activación del inflammasoma y regula la fiebre, mientras que IL-6 participa en la activación de la respuesta de fase aguda en el hígado y en la diferenciación de linfocitos T.

Los eicosanoides, derivados del ácido araquidónico, son otro grupo importante de mediadores de la inflamación. Entre ellos, las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs) y los leucotrienos (LTs) regulan múltiples aspectos de la respuesta inflamatoria. Las prostaglandinas, como la PGE₂, inducen fiebre, aumentan la permeabilidad vascular y sensibilizan las terminaciones nerviosas al dolor. Los leucotrienos, por otro lado, favorecen la quimiotaxis de neutrófilos y la

activación de eosinófilos, desempeñando un papel crucial en la inflamación alérgica y el asma (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Las prostaglandinas, como la PGE₂, desempeñan un papel clave en la generación de la respuesta inflamatoria. Su biosíntesis aumenta significativamente en el tejido inflamado y contribuyen al desarrollo de los signos cardinales de la inflamación aguda. La producción de prostaglandinas depende de la actividad de las sintetas de prostaglandina G/H, conocidas como COX. La COX-2, inducida por estímulos inflamatorios, hormonas y factores de crecimiento, es la fuente más importante de formación de prostanoïdes en la inflamación. (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Además de las citocinas y los eicosanoides, las aminas vasoactivas, como la histamina y la serotonina, son liberadas principalmente por mastocitos y plaquetas en la fase temprana de la inflamación. Estos mediadores promueven la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular, facilitando la extravasación de células inmunitarias y proteínas plasmáticas al sitio de la lesión. Finalmente, el sistema del complemento, una cascada de proteínas plasmáticas juega un papel esencial en la inflamación mediante la opsonización de patógenos, la formación del complejo de ataque a la membrana y la activación de la respuesta inflamatoria. La activación del complemento genera fragmentos como C3a y C5a, que actúan como anafilotoxinas, induciendo la degranulación de mastocitos y la atracción de leucocitos al sitio inflamado (Simons & Simons, 2011).

El equilibrio entre estos mediadores es fundamental para asegurar una inflamación efectiva sin causar daño tisular excesivo. La investigación actual se centra en el desarrollo de terapias dirigidas a modular la producción de estos mediadores y prevenir su desregulación en enfermedades inflamatorias crónicas.

2.6.2. Vías de Señalización en la Inflamación

Las células inmunitarias detectan la presencia de agentes patógenos o señales de daño a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que activan vías de señalización intracelular para inducir la producción de mediadores inflamatorios. Entre las rutas más estudiadas en la inflamación se encuentran la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB), la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4).

2.6.3. Mecanismos de activación: NF- κ B, MAPK y TLR4

NF- κ B: La vía de NF- κ B es un mecanismo central en la regulación de la inflamación. En condiciones normales, NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma, unido a la proteína inhibidora I κ B. Sin embargo, en respuesta a estímulos inflamatorios como el lipopolisacárido (LPS), TNF- α o IL-1 β , la quinasa I κ B (IKK) fosforila y degrada I κ B, liberando NF- κ B para translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes inflamatorios. (Dinarello, 2018).

MAPK: La vía de MAPK regula la producción de citocinas inflamatorias y la proliferación celular. Comprende tres principales familias de quinasas: ERK1/2 (extracelular signal-regulated kinases), p38 MAPK y JNK (c-Jun N-terminal kinases). La activación de p38 MAPK es particularmente importante en la respuesta inflamatoria, ya que modula la producción de TNF- α e IL-1 β en macrófagos activados. A su vez, la vía de JNK regula la apoptosis celular y la producción de mediadores inflamatorios, mientras que ERK1/2 está involucrada en la proliferación y diferenciación celular.

TLR4: El receptor tipo Toll 4 (TLR4) es un PRR que desempeña un papel clave en la inmunidad innata. Su activación por LPS inicia una cascada de señalización que activa NF- κ B y MAPK, promoviendo la producción de citocinas inflamatorias. La activación de TLR4 también puede inducir la expresión de interferones tipo I, regulando la respuesta antiviral. (Kawai & Akira, 2010).

2.6.4. Regulación de la respuesta inflamatoria: control de TNF- α , IL-6 y prostaglandinas

Esta activación (NF- κ B) conduce a la producción de citocinas como TNF- α e IL-6, así como a la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular. Dado su papel en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la aterosclerosis, la inhibición selectiva de NF- κ B se ha convertido en una estrategia terapéutica prometedora. La activación de p38 MAPK es particularmente importante en la respuesta inflamatoria, ya que modula la producción de TNF- α e IL-1 β en macrófagos activados. La activación de TLR4 desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación de NF- κ B y MAPK, lo que resulta en la producción de citocinas proinflamatorias. (Dinarello, 2018).

2.6.5. Estrategias Terapéuticas y Regulación de la Inflamación

Dado el papel fundamental de las vías de señalización inflamatoria en diversas enfermedades, la investigación se ha centrado en desarrollar terapias dirigidas a modular su activación. Entre las estrategias terapéuticas más estudiadas se encuentran los inhibidores de NF- κ B, los moduladores de MAPK y los bloqueadores de TLR4.

Los inhibidores de NF- κ B incluyen compuestos naturales como los flavonoides y terpenos, que han demostrado su capacidad para reducir la activación de esta vía en modelos experimentales. Fármacos como la bardoxolona metil, un activador de la vía Nrf2, también han mostrado potencial para suprimir NF- κ B y disminuir la inflamación crónica. En cuanto a MAPK, los inhibidores selectivos de p38 MAPK han sido evaluados en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, aunque sus efectos secundarios han limitado su aplicación clínica. Por otro lado, los bloqueadores de TLR4, como el eritorán, han sido investigados en la sepsis, aunque con resultados mixtos en ensayos clínicos. Adicionalmente, los glucocorticoides son potentes fármacos antiinflamatorios, y su mecanismo de acción ha sido estudiado, con investigaciones que indican que la constricción de los vasos locales no juega un papel esencial en el efecto antiexudativo de los glucocorticoides en la inflamación proliferativa crónica (Sugio & Tsurufuji, 1981).

La modulación de TLR4 ha sido un objetivo de interés en el desarrollo de terapias antiinflamatorias, dada su implicación en la sepsis y enfermedades inflamatorias crónicas (Akira & Takeda, 2004). Asimismo, la inhibición selectiva de NF- κ B se ha convertido en una estrategia terapéutica prometedora, dado su papel en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la aterosclerosis (Karin & Greten, 2005).

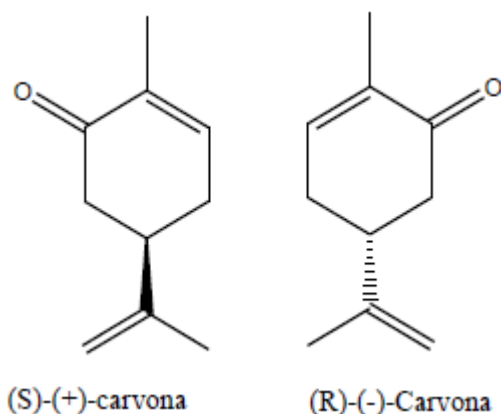
La investigación actual se centra en el desarrollo de terapias dirigidas que puedan modular selectivamente la inflamación sin causar efectos secundarios significativos, dada la necesidad de abordar la inflamación en enfermedades crónicas como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer (Tabas & Glass, 2013). Además, se sigue explorando el papel del reflejo inflamatorio, un mecanismo neuronal que regula la respuesta inflamatoria, como objetivo terapéutico (Tracey, 2002).

2.7. Compuestos Antiinflamatorios y Modulación de la Inflamación

En la búsqueda de terapias más seguras y eficaces, se ha prestado especial atención a compuestos antiinflamatorios de origen natural, como los terpenos, flavonoides y polifenoles. Estos compuestos han mostrado efectos moduladores sobre las vías de señalización inflamatorias y la producción de citocinas proinflamatorias, lo que sugiere su potencial como alternativas terapéuticas frente a los antiinflamatorios convencionales (Newman & Cragg, 2020).

2.7.1. Carvona y terpenos como reguladores de vías inflamatorias.

Los terpenos son una amplia familia de metabolitos secundarios presentes en diversas especies vegetales. Dentro de esta categoría, la carvona, un monoterpeno cetónico, ha sido objeto de estudio por su potencial antiinflamatorio. De manera similar, *Boswellia serrata*, rica en terpenoides como los ácidos boswélicos, ha demostrado actividad antiinflamatoria significativa en modelos de edema de pata inducido por carragenina en ratas (Ismail et al., 2016).



La carvona se encuentra principalmente en aceites esenciales de plantas como la alcaravea, la hierbabuena y el eneldo, y ha demostrado efectos inmunomoduladores en modelos experimentales. Ella es una cetona monocíclica insaturada que existe en la naturaleza como dos enantiómeros o isómeros ópticos que son imágenes especulares no superponibles: la (S)-(+)-carvona y la (R)-(-)-carvona. Ambas moléculas comparten la misma fórmula molecular ($C_{10}H_{14}O$) y una estructura base que consiste en un anillo de seis miembros con una doble ligadura endocíclica y un grupo cetona exocíclico en posición adyacente a esta doble ligadura. (Rodilla et al., 2016).

Los mecanismos por los cuales la carvona ejerce su efecto antiinflamatorio están relacionados con su capacidad para modular vías de señalización clave, como NF- κ B, MAPK y TLR4. Se ha observado que este compuesto puede reducir la activación de NF- κ B, un factor de transcripción que regula la expresión de genes

proinflamatorios, incluyendo TNF- α e IL-6. Además, estudios han demostrado que la carvona puede inhibir la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, lo que sugiere su potencial para reducir la inflamación en diversas patologías crónicas. Carvacryl acetato, un derivado de carvacrol también ha demostrado reducir la respuesta nociceptiva e inflamatoria en ratones, lo que subraya el potencial de los derivados de terpenos en la modulación de la inflamación (Damasceno et al., 2014).

Además de la carvona, otros terpenos han mostrado actividad antiinflamatoria significativa. Por ejemplo, los terpenoides presentes en diversas plantas, más allá del *Cannabis* género, actúan como ligandos cannabimiméticos, modulando la inflamación (Gonçalves et al., 2020). Estos hallazgos resaltan el potencial de los terpenos como moduladores de la respuesta inflamatoria y justifican su estudio en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

2.7.1.1. Efectos sobre modelos celulares y potencial terapéutico

El estudio de la actividad antiinflamatoria de la carvona y otros terpenos se han desarrollado modelos celulares *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En estudios en línea celular de macrófagos RAW 264.7, se ha observado que la carvona reduce la producción de TNF- α e IL-6 en respuesta a la estimulación con (LPS), lo que sugiere su capacidad para modular la respuesta inmune innata. El efecto se atribuye a la inhibición de la activación de NF- κ B y a la modulación de la vía MAPK, previniendo la amplificación de la respuesta inflamatoria (Rufino et al., 2015).

En modelos animales, los efectos de la carvona han sido evaluados en condiciones inflamatorias experimentales. Estudios en ratas con artritis han mostrado que la administración de carvona reduce la inflamación articular y mejora la movilidad, efectos comparables a los de fármacos antiinflamatorios. Además, se ha reportado que este monoterpeno puede atenuar el daño hepático y renal asociado a la inflamación crónica, lo que indica su potencial para proteger los tejidos frente al estrés oxidativo y el daño inflamatorio (Devendra et al., 2012).

El potencial terapéutico de la carvona y otros terpenos ha llevado al desarrollo de formulaciones farmacéuticas y nutraceuticas que buscan aprovechar sus propiedades antiinflamatorias. En este contexto, se han explorado estrategias como la encapsulación en nanopartículas y la formulación en emulsiones para mejorar la

biodisponibilidad y estabilidad de estos compuestos en el organismo. Sin embargo, aunque los estudios preclínicos han proporcionado evidencia prometedora, aún se requieren ensayos clínicos para validar su eficacia y seguridad en humanos. El interés creciente en compuestos naturales como la carvona y otros terpenos refleja la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con menos efectos adversos en comparación con los fármacos antiinflamatorios sintéticos. La modulación de vías de señalización inflamatoria mediante estos compuestos representa una estrategia prometedora para el manejo de enfermedades inflamatorias crónicas y sugiere la importancia de continuar investigando su potencial en la medicina moderna (Atanasov et al., 2015).

2.8. Inflamación y Enfermedades Crónicas

En este estado inflamatorio persistente se puede dañar los tejidos y órganos, contribuyendo al desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas y cáncer (Ricciotti & FitzGerald, 2011). La transición de la inflamación aguda a la crónica implica una compleja interacción de células inmunitarias, mediadores inflamatorios y factores ambientales. En la inflamación crónica, la resolución normal del proceso inflamatorio se ve comprometida, lo que lleva a un ciclo continuo de daño tisular y reparación. Este estado inflamatorio de bajo grado puede persistir durante meses o incluso años, contribuyendo al desarrollo de diversas patologías crónicas.

2.8.1. Inflamación crónica y enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Crohn, son trastornos en los que el sistema inmunitario ataca erróneamente los tejidos y órganos del propio cuerpo. Este ataque autoinmune desencadena una respuesta inflamatoria crónica que perpetúa el daño tisular y la disfunción orgánica. En la artritis reumatoide, por ejemplo, el sistema inmunitario ataca la membrana sinovial que recubre las articulaciones, lo que lleva a inflamación, dolor y destrucción progresiva del cartílago y el hueso. En el lupus eritematoso sistémico, la inflamación crónica puede afectar a múltiples órganos, incluyendo la piel, las articulaciones, los riñones y el cerebro. Los mediadores inflamatorios, como las citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y las

prostaglandinas, desempeñan un papel central en la perpetuación de la respuesta autoinmune y la progresión de la enfermedad. Estas moléculas señalizadoras reclutan y activan células inmunitarias, promueven la angiogénesis y contribuyen al daño tisular.

La comprensión de los mecanismos moleculares que impulsan la inflamación crónica en las enfermedades autoinmunes ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas, como los inhibidores de TNF- α y los anticuerpos monoclonales contra citocinas específicas. Estas terapias han revolucionado el tratamiento de muchas enfermedades autoinmunes, mejorando significativamente la calidad de vida de los pacientes. La inflamación crónica es un factor importante en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, y la activación de factores como el NF- κ B, contribuye a la perpetuación de la respuesta autoinmune (Karin & Greten, 2005).

2.8.2. Inflamación y enfermedades cardiovasculares

La inflamación crónica representa un factor patogénico central en las enfermedades cardiovasculares, especialmente en la aterosclerosis, que subyace a la mayoría de los eventos cardiovasculares adversos mayores (Libby, 2021). La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la íntima arterial, lo que desencadena una respuesta inflamatoria compleja.

La evidencia actual destaca el papel de diversas células inmunitarias y mediadores inflamatorios en la progresión de la aterosclerosis. Las células endoteliales activadas por LDL oxidadas expresan moléculas de adhesión que reclutan monocitos y linfocitos T. Los macrófagos, derivados de los monocitos, internalizan las LDL oxidadas y se transforman en células espumosas, que contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica.

Además, las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 β (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6), desempeñan su papel en la amplificación de la respuesta inflamatoria y la progresión de la placa. Estas citocinas promueven la proliferación de células musculares lisas, la acumulación de matriz extracelular y la formación de un núcleo necrótico en la placa.

La inflamación crónica también contribuye a la inestabilidad de la placa, lo que aumenta el riesgo de ruptura de la placa y trombosis. La ruptura de la placa expone el contenido trombogénico al torrente sanguíneo, lo que lleva a la formación de un trombo que puede obstruir el flujo sanguíneo y causar un evento cardiovascular agudo, como un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular.

Más allá de la aterosclerosis, la inflamación crónica también está implicada en otras enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardíaca y la fibrilación auricular. En la insuficiencia cardíaca, la inflamación puede contribuir a la remodelación ventricular y la disfunción miocárdica. En la fibrilación auricular, la inflamación puede promover la fibrosis auricular y la arritmogénesis. Los inhibidores de citocinas, los anticuerpos monoclonales contra moléculas de adhesión y los inhibidores de la señalización de células inmunitarias son algunas de las estrategias terapéuticas en investigación. Por ejemplo, el ensayo CANTOS demostró la importancia de la inhibición de la IL-1 β en la prevención de eventos cardiovasculares (Ridker et al., 2017). Además, la inflamación crónica se considera un factor etiológico en enfermedades a lo largo de la vida (Furman et al., 2019).

2.8.3. Inflamación y enfermedades metabólicas

La inflamación crónica emerge como un factor patogénico central en el desarrollo y progresión de las enfermedades metabólicas, particularmente la obesidad y la diabetes tipo 2 (Hotamisligil, 2006). En la condición de obesidad, el tejido adiposo, que trasciende su función tradicional de almacenamiento de energía, se transforma en un órgano endocrino dinámico. Este tejido adiposo hipertrófico y disfuncional libera un espectro de adipocinas proinflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6). Estas moléculas señalizadoras no solo perpetúan la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, sino que también orquestan una cascada de eventos que conducen a la resistencia a la insulina.

A nivel molecular, la inflamación crónica interfiere con la cascada de señalización del receptor de insulina en tejidos periféricos críticos, como el músculo esquelético y el hígado. Esta interferencia resulta en una disminución de la captación y utilización de glucosa, lo que conduce a la hiperglucemia, un sello distintivo de la diabetes tipo 2. Además, la inflamación crónica contribuye a la lipólisis desregulada,

lo que lleva a un aumento de los ácidos grasos libres circulantes, que a su vez exacerban la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica.

En la diabetes tipo 2, la hiperglucemia crónica y la hiperlipidemia actúan como potentes activadores de las vías inflamatorias. Estos estados metabólicos adversos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez activan el factor nuclear kappa B (NF- κ B), un regulador maestro de la transcripción de genes proinflamatorios. La activación de NF- κ B desencadena la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y otras moléculas efectoras que amplifican la respuesta inflamatoria y perpetúan la resistencia a la insulina.

Además, la inflamación crónica contribuye significativamente a las complicaciones diabéticas, como la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía. El daño microvascular y macrovascular, impulsado por la inflamación crónica, conduce a la disfunción y la falla de órganos diana. Por ejemplo, la inflamación crónica en el riñón contribuye a la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial, lo que lleva a la nefropatía diabética. Del mismo modo, la inflamación crónica en los nervios periféricos conduce a la desmielinización y la degeneración axonal, lo que resulta en neuropatía diabética (Donath & Shoelson, 2011). La inflamación crónica se erige como un factor patogénico fundamental en las enfermedades metabólicas, impulsando la resistencia a la insulina, la disfunción metabólica y las complicaciones diabéticas. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la inflamación crónica es crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas.

2.8.4. Neuro inflamación y enfermedades neurodegenerativas

La neuro inflamación, o inflamación en el sistema nervioso central, está implicada en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (Amor et al., 2014). En estas enfermedades, la activación de la microglía, las células inmunitarias residentes del cerebro, conduce a la producción de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas, que pueden dañar las neuronas y contribuir a la neurodegeneración.

En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares desencadena una respuesta inflamatoria crónica que puede

exacerbar la patología de la enfermedad. La microglía activada libera mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción sináptica y la muerte neuronal. En la enfermedad de Parkinson, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra se acompaña de activación microglial e inflamación, lo que puede contribuir a la progresión de la enfermedad. En la esclerosis múltiple, la infiltración de células inmunitarias en el sistema nervioso central conduce a la desmielinización y la neurodegeneración, lo que resulta en síntomas neurológicos (Heneka et al., 2015). La neuro inflamación es un proceso complejo que involucra la activación de la microglía y los astrocitos, las células inmunitarias residentes del cerebro. En condiciones normales, la microglía y los astrocitos tienen un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central al eliminar los desechos y los patógenos. Sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativas, la activación crónica de estas células tiene efectos perjudiciales.

La activación de la microglía y los astrocitos conduce a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios, como citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos mediadores pueden dañar las neuronas a través de varios mecanismos, incluyendo la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. Además, la inflamación crónica puede interferir con la neurogénesis y la plasticidad sináptica, lo que contribuye a la disfunción cognitiva y motora en las enfermedades neurodegenerativas.

En el Alzheimer, la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares desencadena una respuesta inflamatoria crónica que puede exacerbar la patología de la enfermedad. La microglía activada se acumula alrededor de las placas amiloides y libera mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción sináptica y la muerte neuronal. Además, la inflamación crónica puede promover la fosforilación de la proteína tau, llevando a la formación de ovillos neurofibrilares.

En la enfermedad de Parkinson, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra se acompaña de activación microglial e inflamación. La microglía activada libera mediadores inflamatorios que pueden dañar las neuronas dopaminérgicas restantes y contribuir a la progresión de la enfermedad. La inflamación crónica interfiere con la función de los ganglios basales, causando síntomas motores observados en la enfermedad de Parkinson.

En la esclerosis múltiple, la infiltración de células inmunitarias en el sistema nervioso central conduce a la desmielinización y la neurodegeneración. Las células T y los macrófagos infiltrados liberan mediadores que dañan la mielina y los axones, resultando en síntomas neurológicos como debilidad muscular, problemas de coordinación y déficits cognitivos. Además, la inflamación crónica puede promover la formación de placas escleróticas en el cerebro y la médula.

La neuro inflamación es un área de investigación activa dentro de las enfermedades neurodegenerativas. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la neuro inflamación puede conducir al desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir o retrasar la progresión de estas enfermedades devastadoras.

2.8.5. Inflamación crónica y cáncer

La inflamación crónica puede promover la carcinogénesis al proporcionar un microambiente que favorece la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis (Mantovani et al., 2008). Este microambiente inflamatorio está caracterizado por la infiltración de células inmunitarias, la producción de mediadores inflamatorios y la remodelación de la matriz extracelular, creando un caldo de cultivo para el desarrollo y progresión del cáncer. Varios tipos de cáncer, como el cáncer de colon, el cáncer de hígado y el cáncer de pulmón, están estrechamente asociados con la inflamación crónica. En estos casos, la inflamación no solo contribuye al inicio del tumor, sino que también promueve su crecimiento, invasión y diseminación a sitios distantes.

Los mediadores inflamatorios, como citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas (CXCL8, CCL2) y factores de crecimiento (VEGF, EGF), desempeñan un papel crucial en la promoción del cáncer. Estos mediadores pueden estimular directamente la proliferación de células tumorales, promover la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno al tumor en crecimiento, y facilitar la metástasis al crear un microambiente favorable para la invasión y diseminación de células tumorales. En el cáncer de colon, afecciones inflamatorias crónicas del intestino, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, aumentan significativamente el riesgo de carcinoma colorrectal. La inflamación crónica en el intestino puede inducir mutaciones genéticas en las células epiteliales, promover la proliferación de células

con mutaciones y suprimir la apoptosis de células dañadas, lo que lleva a la formación de tumores. En el cáncer de hígado, la hepatitis viral crónica (especialmente la hepatitis B y C) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) pueden provocar cirrosis, un estado de inflamación crónica y fibrosis en el hígado. La cirrosis aumenta el riesgo de carcinoma hepatocelular, el tipo más común de cáncer de hígado. La inflamación crónica en el hígado puede dañar el ADN de las células hepáticas, promover la proliferación de células dañadas y suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral. En el cáncer de pulmón, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la exposición crónica al asbesto, afecciones inflamatorias crónicas de los pulmones, aumentan el riesgo de carcinoma de pulmón. La inflamación crónica en los pulmones puede dañar el ADN de las células epiteliales, promover la proliferación de células dañadas y suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral.

La inflamación crónica también se ha implicado en otros tipos de cáncer, como el cáncer de páncreas, el cáncer de próstata y el cáncer de mama. La inflamación crónica y el cáncer están intrínsecamente ligados, siendo clave entender esta relación para prevención y tratamiento. La inflamación persistente puede dañar el ADN y promover la proliferación celular, creando un entorno favorable para el desarrollo tumoral. Identificar mediadores inflamatorios clave (citocinas, quimiocinas) y vías de señalización implicadas (NF- κ B, STAT3) es fundamental para comprender este vínculo. Estos componentes inflamatorios influyen en todas las etapas del cáncer, desde la iniciación hasta la metástasis. El conocimiento de esta interacción permite el desarrollo de terapias dirigidas. Estas terapias buscan interrumpir la conexión patológica entre inflamación y cáncer, bloqueando mediadores específicos o inhibiendo vías de señalización clave. El objetivo es privar al cáncer del apoyo que la inflamación crónica le brinda para su crecimiento y diseminación. Esta estrategia ofrece nuevas herramientas terapéuticas para combatir el cáncer. La investigación continua en esta área es esencial para descubrir nuevas dianas y optimizar las estrategias existentes, mejorando así los resultados para los pacientes con cáncer. (Coussens & Werb, 2002).

2.9. Técnicas Experimentales en la Investigación de la Inflamación

2.9.1. Ensayos de Viabilidad Celular y Evaluación de Toxicidad

Los ensayos de viabilidad celular y evaluación de toxicidad representan un conjunto de técnicas indispensables en la investigación biomédica, farmacológica y toxicológica. Su propósito primordial es discernir si una sustancia o tratamiento propuesto es seguro y eficaz para las células. En esencia, estos ensayos buscan responder a dos preguntas críticas: ¿están las células vivas y funcionando correctamente? y ¿está la sustancia en cuestión causando algún daño celular?

La viabilidad celular se define como la capacidad de las células para mantener sus funciones vitales, incluyendo el metabolismo, la proliferación y la integridad de la membrana. Los ensayos de viabilidad celular, por lo tanto, miden estos parámetros para evaluar la salud general de una población celular. Por otro lado, la evaluación de toxicidad se centra en cuantificar el grado en que una sustancia puede inducir daño o muerte celular. Esta distinción es crucial, ya que una sustancia puede no ser inmediatamente tóxica, pero aun así afectar negativamente la viabilidad celular.

2.9.2. Metodologías Clave en Ensayos de Viabilidad y Toxicidad

La diversidad de ensayos disponibles refleja la complejidad de la biología celular. A continuación, se describen algunas de las metodologías más utilizadas:

Ensayos Colorimétricos: Estos ensayos se basan en la medición de cambios en el color de un indicador químico, los cuales son proporcionales a la actividad metabólica de las células. Un ejemplo común es el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), donde las células viables reducen el MTT a un producto de formazán púrpura.

Ensayos de Fluorescencia: Estos ensayos emplean marcadores fluorescentes que se unen a componentes celulares específicos, como el ADN o las enzimas. La intensidad de la fluorescencia emitida proporciona una medida de la viabilidad o la muerte celular. Por ejemplo, la tinción con yoduro de propidio permite identificar células con membranas dañadas.

Ensayos de Luminiscencia: Estos ensayos miden la producción de luz generada por reacciones enzimáticas, como la actividad de la ATPasa. La cantidad de luz

emitida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente, lo que a su vez refleja la cantidad de células metabólicamente activas.

Ensayos de Integridad de Membrana: Estos ensayos evalúan la permeabilidad de la membrana celular, un indicador clave de la salud celular. La liberación de enzimas citoplasmáticas, como el lactato deshidrogenasa (LDH), en el medio de cultivo señala daño en la membrana.

2.9.3. Importancia y Aplicaciones

La relevancia de estos ensayos se extiende a múltiples áreas:

Desarrollo de fármacos: Permiten identificar compuestos con potencial terapéutico y evaluar su seguridad antes de su uso en ensayos clínicos.

Toxicología Ambiental: Ayudan a determinar los efectos nocivos de sustancias químicas y contaminantes en la salud humana y el medio ambiente.

Investigación Básica: Proporcionan herramientas para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la viabilidad y la muerte celular.

2.9.4. Cuantificación de Mediadores Inflamatorios: ELISA y qPCR

ELISA: Cuantificación de Proteínas Inflamatorias

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica de inmunoensayo ampliamente utilizada para detectar y cuantificar proteínas, como las citocinas, en muestras biológicas. Su alta sensibilidad y especificidad lo convierten en una herramienta valiosa para la investigación de la inflamación.

Principios Fundamentales:

- El ELISA se basa en la interacción antígeno-anticuerpo, donde un anticuerpo específico se une al mediador inflamatorio de interés.
- La señal generada por una reacción enzimática es proporcional a la cantidad del mediador presente en la muestra.
- Existen diferentes formatos de ELISA, como el ELISA directo, indirecto, sándwich y competitivo, cada uno con sus propias ventajas y desventajas.

Aplicaciones Clave:

- Medición de los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y antiinflamatorias (IL-10).
- Evaluación de la eficacia de terapias antiinflamatorias en ensayos clínicos.
- Diagnóstico de enfermedades inflamatorias y seguimiento de la progresión de la enfermedad.

2.9.5. qPCR: Cuantificación de la Expresión Génica Inflamatoria

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es una técnica de biología molecular que permite cuantificar la expresión de genes relacionados con la inflamación. Su alta sensibilidad y especificidad lo convierten en una herramienta poderosa para estudiar la regulación de la respuesta inflamatoria a nivel transcripcional.

Principios Fundamentales:

- La qPCR se basa en la amplificación de secuencias de ADN específicas, utilizando cebadores y una enzima polimerasa.
- La cantidad de ADN amplificado se mide en tiempo real, lo que permite determinar la cantidad de ARN mensajero (ARNm) presente en la muestra.
- La qPCR permite detectar incluso pequeñas variaciones en la expresión génica, lo que la hace ideal para estudiar la regulación fina de la respuesta inflamatoria.

Aplicaciones Clave:

- Análisis de la expresión de genes de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios.
- Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta inflamatoria en diferentes contextos biológicos.
- Identificación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La Sinergia de ELISA y qPCR

La combinación de ELISA y qPCR proporciona una visión integral de la respuesta inflamatoria, al permitir la cuantificación tanto de proteínas como de la expresión génica. Esta sinergia es crucial para comprender la dinámica de la inflamación y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La elección de la técnica adecuada depende del mediador inflamatorio de interés, la sensibilidad requerida y la disponibilidad de muestras. Es fundamental utilizar controles adecuados y realizar análisis estadísticos rigurosos para garantizar la validez de los resultados.

2.9.6 Modelos Experimentales de Inflamación: *In Vitro* vs. *In Vivo*

La investigación de la inflamación requiere el uso de modelos experimentales que permitan estudiar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en esta respuesta biológica. Los modelos *in vitro* e *in vivo* ofrecen diferentes ventajas y desventajas, y la elección del modelo adecuado depende del objetivo del estudio.

Modelos *In Vitro* utilizan células o tejidos aislados para estudiar la inflamación en un entorno controlado.

Ventajas:

- Permiten un alto grado de control sobre las variables experimentales.
- Son más económicos y rápidos que los modelos *in vivo*.
- Reducen el uso de animales en la investigación.
- Permiten el estudio de mecanismos celulares y moleculares específicos.

Desventajas:

- No reproducen la complejidad de la respuesta inflamatoria en un organismo vivo.

- Pueden no predecir con precisión los efectos de los fármacos o tratamientos en humanos.
- La falta de interacciones sistémicas.

Ejemplos:

- Cultivos celulares de macrófagos o células endoteliales estimulados con lipopolisacárido (LPS) o citocinas.
- Modelos de co-cultivo que simulan la interacción entre diferentes tipos celulares.
- El uso de modelos de tejidos 3D.

Modelos *in vivo* utilizan animales de laboratorio para estudiar la inflamación en un organismo completo.

Ventajas:

- Reproducen la complejidad de la respuesta inflamatoria en un organismo vivo.
- Permiten estudiar los efectos sistémicos de la inflamación.
- Proporcionan una mayor relevancia clínica para la investigación traslacional.

Desventajas:

- Son más costosos y requieren más tiempo que los modelos *in vitro*.
- Plantean consideraciones éticas relacionadas con el uso de animales.
- La extrapolación de los resultados a humanos puede ser compleja.

Ejemplos:

- Modelos de inflamación inducida por LPS en ratones o ratas.
- Modelos de artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal en animales.
- Modelos de inflamación crónica.

2.10. Aplicaciones de la Investigación en Inflamación

La investigación en inflamación abarca un extenso espectro de aplicaciones que impactan directamente en la salud humana y el desarrollo de estrategias terapéuticas. Su alcance va mucho más allá del simple alivio de los síntomas, adentrándose en la comprensión fundamental de los procesos patológicos subyacentes de enfermedades crónicas y agudas. Algunas de las áreas clave donde la investigación en inflamación despliega su significativa influencia incluyen:

Desarrollo de Terapias Antiinflamatorias:

- La investigación en inflamación es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan modular la respuesta inflamatoria.
- Esto incluye la identificación de nuevos blancos terapéuticos y el diseño de fármacos que puedan inhibir la producción de mediadores inflamatorios.
- Ejemplos de esto son los tratamientos para la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis.

Comprensión de Enfermedades Crónicas:

- La inflamación crónica desempeña un papel clave en la patogénesis de muchas enfermedades crónicas, como la aterosclerosis, la diabetes y el cáncer.
- La investigación en inflamación ayuda a comprender los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a estas enfermedades, lo que puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento.
- Permite identificar componentes específicos (proteínas, enzimas, vías de señalización) que pueden convertirse en dianas terapéuticas novedosas

Diagnóstico y Pronóstico de Enfermedades:

- Los marcadores inflamatorios pueden utilizarse para diagnosticar y pronosticar diversas enfermedades.

- Por ejemplo, la proteína C reactiva (PCR) es un marcador inflamatorio que se utiliza para evaluar el riesgo de enfermedad cardiovascular.
- La investigación continua en estos marcadores ayuda a la mejora de la precisión en los diagnósticos.
- Impulsa el descubrimiento y la validación de nuevos biomarcadores inflamatorios con mayor especificidad y sensibilidad para diferentes enfermedades. Estos nuevos marcadores podrían permitir diagnósticos más tempranos, una mejor estratificación del riesgo de la enfermedad y un seguimiento más preciso de la respuesta al tratamiento.
- La investigación puede llevar al desarrollo de paneles de biomarcadores inflamatorios, que combinan la medición de varios marcadores simultáneamente. Estos paneles podrían proporcionar una visión más completa del estado inflamatorio del paciente, mejorando la precisión diagnóstica y pronóstica en enfermedades complejas donde un solo marcador puede ser insuficiente.

Medicina Regenerativa:

- La inflamación desempeña un papel crucial en la regeneración de tejidos.
- La investigación en inflamación puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias para promover la regeneración de tejidos dañados, como en lesiones de la médula espinal o enfermedades cardíacas.

Investigación en Inmunología:

- La inflamación es una parte integral de la respuesta inmune.
- La investigación en inflamación contribuye a una mejor comprensión de cómo el sistema inmune responde a infecciones, lesiones y otras amenazas.

Oncología:

- La inflamación crónica crea un ambiente pro-cancerígeno al dañar el ADN e inducir mutaciones. Libera factores que estimulan la proliferación y supervivencia de células precancerosas y promueve la formación de vasos sanguíneos tumorales (angiogénesis). Facilita la invasión y metástasis al degradar tejidos circundantes y, puede suprimir la respuesta inmunitaria contra el tumor.
- La investigación en inflamación está explorando cómo la modulación de la respuesta inflamatoria. Un ejemplo de tratamiento innovador para el cáncer, con un fuerte componente de modulación del sistema inmunitario y, por ende, de la inflamación, son las terapias con células CAR T (Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy).

2.11. Importancia Continua de la investigación en Inflamación.

La investigación en inflamación es de trascendental importancia global, dada su conexión con la patogénesis de numerosas enfermedades crónicas y agudas que impactan significativamente la salud y el bienestar de las poblaciones a nivel mundial, incluyendo condiciones como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el asma, la aterosclerosis y el Alzheimer. Profundizar en los mecanismos moleculares y celulares que orquestan la respuesta antiinflamatoria, incluyendo la identificación de mediadores pro y antiinflamatorios, las vías de señalización intracelular involucradas como la **vía del NF- κ B**, **la vía de las MAP Quinasas**, **la vía de las JAK-STAT**, **la vía del Inflamasoma**, **la vía de la Fosfolipasa A2 y el Ácido Araquidónico**, y **la vía de la PI3K/Akt**, resulta esencial para el diseño y desarrollo de terapias más eficaces para diversas patologías. Una comprensión exhaustiva de los procesos inflamatorios abre la puerta a la creación de fármacos más selectivos y con menos efectos secundarios, y también podría conducir al desarrollo de intervenciones tempranas y enfoques preventivos que mitiguen la carga de estas enfermedades en la sociedad.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de derivados de R-(-)- y S-(+)-carvona.

Las cavonas sintéticas se obtuvieron en el laboratorio de Química Orgánica del Departamento de Química de la Universidade da Beira Interior, Portugal, bajo la dirección del Doctor Jesús Rodilla. Estos terpenos se purificaron y caracterizaron como se describe a continuación mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopía infrarroja (IR) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (MS-AR). (Rodilla et al., 2016).

3.1.1. Síntesis General

Todos los reactivos químicos se compraron con la mayor pureza disponible y se utilizaron sin purificación adicional. El éter dietílico, el tetrahidrofurano y el benceno se destilaron a partir de sodio y benzofenona bajo atmósfera de argón; el diclorometano y la piridina se destilaron a partir de hidruro de calcio bajo atmósfera de argón. En la síntesis de derivados de carvona, se dispusieron carvona, ácido nitrobenzoico y N-bromosuccinimida en diclorometano, empleando como catalizador prolina II (al 2% o 20% de carga) o alternativamente para mejorar el rendimiento y sostenibilidad, hidrotalcita en lugar de AlCl_3 . La mezcla se agitó durante seis días a temperatura ambiente o $39\text{ }^\circ\text{C}$, tras lo cual se evaporó el solvente y los compuestos resultantes se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla de n-hexano y acetato de etilo. El protocolo específico con prolina II al 2% generó los bromoésteres 7 (34%) y 8 (20%) con un dr del 26%, junto con subproductos 5 (16%) y 6 (4%), mientras que el uso de hidrotalcita demostró ser un catalizador eficiente, mejorando significativamente el rendimiento de los compuestos. (Pombal et al., 2018; Rodilla et al., 2016).

3.1.2. Caracterización

Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se registraron en un Bruker Advance 400 MHz DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) (Bruker Biospin, Wissembourg, Francia) y en un VARIAN 200 (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C) (Varian Inc, Palo Alto, California, EE. UU.). Los desplazamientos químicos se expresan en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Todos los espectros se realizaron en CDCl_3 como solvente y se referenciaron al pico residual de CHCl_3 en $\delta = 7.26$ ppm para ^1H y $\delta = 77.0$ ppm para ^{13}C .

Cristalografía de Rayos X. Se obtuvieron monocristales de 7 y 8 para el análisis de DRX (difracción de rayos X) por evaporación lenta de una solución en hexano/CH₂Cl₂ (98:2) a temperatura ambiente. Los datos de intensidad de difracción de rayos X se recolectaron para los compuestos 7 y 8 en un difractor de rayos X de monocristal Bruker Kappa Apex II (Bruker AXS Inc) con monocromador de grafito y detector CCD para la recolección de datos de difracción de cristales únicos montados en fibra de vidrio. Los parámetros de la celda unitaria se determinaron a partir de la difracción de 36 fotogramas, y los datos se integraron con el software SAINT. Se aplicó una corrección por absorción mediante el método multiscan (SADABS). La estructura cristalina se resolvió por métodos directos y se refinó por mínimos cuadrados de matriz completa utilizando el software SHELXTL, con átomos no de hidrógeno refinados anisotrópicamente y átomos de hidrógeno posicionados geoméricamente (Pombal da Silva, 2018).

3.1.3. Catálisis con hidrotalcita

Para obtener los compuestos requeridos, el estudio se inició utilizando un ácido de Lewis como AlCl₃ y peróxido de hidrógeno como oxidante. La epoxidación tuvo lugar en el doble enlace terminal, obteniéndose el epóxido 2 y un rendimiento moderado de los compuestos 7 y 8. La estereoquímica absoluta fue determinada mediante experimentos de NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), una técnica de RMN que permite establecer relaciones espaciales entre núcleos atómicos dentro de una molécula, lo que a su vez revela su configuración tridimensional. Los compuestos resultaron de la epoxidación del doble enlace terminal de la carvona, seguida de la oxidación de Baeyer-Villiger de la cetona y la posterior apertura del epóxido por el grupo ácido resultante de la lactona. La reacción de Baeyer-Villiger es una reacción orgánica que convierte una cetona en un éster por la inserción de un átomo de oxígeno entre el grupo carbonilo y uno de los grupos alquilo adyacentes, utilizando un perácido como oxidante. En este caso, el peróxido de hidrógeno, en presencia del catalizador, generó in situ la especie peracídica necesaria para la oxidación de Baeyer-Villiger. La apertura del epóxido por el ácido carboxílico intramolecularmente condujo a la formación de los compuestos 7 y 8. Las hidrotalcitas son materiales laminares doble hidróxidos aniónicos (LDHs) que han ganado atención en catálisis debido a su basicidad, y capacidad de intercambio aniónico. (Pombal et al., 2018; Rodilla et al., 2016).

3.2. Síntesis de epóxidos derivados de la 7,8-carvona.

3.2.1. Bromoésteres.

Los derivados halogenados se sintetizaron mediante reacciones de adición electrofílica de halógenos (bromo o cloro) al doble enlace exocíclico de la (R)-(-)-carvona, utilizando bromo elemental (Br_2) o cloro elemental (Cl_2) en disolventes inertes como diclorometano (CH_2Cl_2), junto con la (R)-(-)-carvona original. El presente trabajo describe la síntesis separada de estos 7,8-epoxiderivados a partir de bromoésteres de carvona mediante un procedimiento organocatalizado en condiciones ácidas, aprovechando la diferente reactividad de los dobles enlaces de la carvona. La selección de organocatalizadores (prolina, quinina, quinidina y difenilprolinol) se basó en su capacidad para facilitar la transferencia de bromo (utilizando NBS) y formar complejos con halógenos, permitiendo la obtención de los bromoderivados intermedios en diclorometano como solvente, dando paso a una nueva vía de acceso a estos epóxidos (Pombal et al., 2018; Pombal da Silva, 2019).

3.2.1.1. (5R,7RS)-7,8-Dibromocarvona (6). CAR: 22-5, 23-6, 23-7.

Se obtuvo con un rendimiento del 4% (82.0 mg) mediante cromatografía en columna usando n-hexano/EtOAc (95:5). Presenta una rotación óptica $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -10.6$ (c = 1.88 mezcla de diastereómeros 3/1 en CHCl_3), bandas características en el espectro IR (película) $\tilde{\nu}$: 2980, 2923, 1668, 1380, 1257, 1083, 1060, 904, 711; y espectros de RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.71 (1H, dt, J = 15.0, 4.6 Hz, H-6), 3.93 (1H, m, Ha-8), 3.82 (1H, d, J = 10.3 Hz, Hb-8), 2.60 (2H, m, H-6), 2.42 (3H, m, H-5), 1.84 (3H, s, H-9), 1.76 (s, 3H, H-10); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ = 198.4, 143.4, 135.3, 71.0, 42.3, 40.7, 40.6, 28.8, 27.9, 15.6; HRMS (IE) m/z calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}$ 308.9484 (M + H^+) encontrado 308.9479.

3.2.1.2. (5R,7R)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoato)carvona (7). CAR: 26-12, 29-11.

Obteniendo un rendimiento de 898.1 mg (34%) tras purificación con n-hexano/EtOAc (7:3). El compuesto presenta una rotación óptica $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +41.7$ (c = 0.48 en CHCl_3); bandas IR (película) $\tilde{\nu}$: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 730; y espectros de RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.91 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-6'), 7.72 (1H, m, H-5'), 7.64 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.74 (1H, m, H-3), 4.06 (1H, d, J = 11.1 Hz, Ha-8), 4.01 (1H, d, J = 11.1 Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, m,

Ha-6), 2.43 (1H, m, Ha-4), 2.29 (1H, m, Hb-6), 2.20 (1H, dd, J = 15.9, 14.2 Hz, Hb-4), 1.74 (s, 3H, H-10), 1.72 (s, 3H, H-9); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 198.1, 164.4, 147.3, 144.5, 135.3, 133.4, 131.6, 129.7, 128.5, 124.0, 85.4, 41.0, 38.5, 35.4, 26.1, 19.0, 15.6; C₁₂H₁₁BrNO₅Na. Se confirmó mediante HRMS (m/z calculado 418.0260, encontrado 418.0265).

3.2.1.3. (5R,7S)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoato) carvona (8). CAR 26-14, 29-13 Isómero 1. CAR R2-12 Isómero 2.

Se obtuvo un rendimiento del 20% (528.3 mg) mediante cromatografía en columna (n-hexano/EtOAc, 7:3). El compuesto presenta una rotación óptica [α]₂₀^D = +6.9 (c = 1.44 en CHCl₃); espectro IR $\tilde{\nu}$: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 711; y espectros de RMN de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.91 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-6'), 7.66 (1H, m, H-5'), 7.65 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.68 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, d, J = 11.2 Hz, Ha-8), 3.90 (1H, d, J = 11.2 Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.58 (1H, m, Ha-6), 2.36 (1H, m, Ha-4), 2.24 (1H, dd, J = 15.8, 14.7 Hz, Hb-6), 2.19 (1H, m, Hb-4), 1.72 (3H, s, H-9), 1.71 (3H, s, H-10). ; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 198.5, 164.4, 147.1, 143.4, 135.6, 133.4, 133.1, 129.5, 128.5, 124.0, 85.2, 40.9, 38.2, 35.5, 26.3, 18.7, 15.6; C₁₂H₁₁BrNO₅Na⁺ 418.0266 (M + Na⁺) fórmula confirmada mediante HRMS (IE) m/z encontrado 418.0265.

3.2.1.4. 7-hidroxi-8-(2-nitrobenzoato)carvona. CAR 13-18.

Fue purificado por cromatografía en columna (gel de sílice, hexano/EtOAc 5:5). IV: 3435; 2979; 1707; 1657; 1578; 1530; 1349; 1289; 1253; 1125; 1072; 777; 733 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.80 (1H; m; H-6'); 7.71 (3H; ddd; J= 7.3, 2.2, 1.2 Hz; H-12, H-15, H-4'); 7.61 (1H; m; H-3'); 6.74 (1H; m; H-3); 4.53 (1H, s; OH); 4.22 (2H; m; H-8); 2.64 (2H; m; H-4); 2.64 (1H; m; Ha- 6); 2.31 (2H; m; Hb-6, H-5); 1.69 (3H; s; H-10); 1.19 (3H; d; J= 2.7 Hz; H-9). ¹³C RMN (400 MHz; CDCl₃) δ: 200.6 (C-1); 179.1 (C-1'); 165.2 (C-7'); 145.4 (C-3); 135.1 (C-2); 133.1 (C-4'); 133.1 (C- 5'); 132.2 (C-3'); 130.2 (C-2'); 123.8 (C-6'); 72.3 (C-7); 71.0 (C-8); 41.7 (C-5); 38.4 (C-6); 29.6 (C-4); 20.9 (C-9); 15.5 (C-10). [α]₂₀^D = +5.5 c = 1.98 mg/mL CHCl₃. HRMS (EI) calculado para C₁₂H₁₁BrNO₅Na requiere (M+Na) 334.1285; encontrado 334.1286.

3.3. Reactivos y Medios de Cultivo

3.3.1. Reactivos y sustancias biológicas

Lipopolisacárido (LPS): Se utilizó LPS de *Escherichia coli* (serotipo especificado por el proveedor) como un potente inductor de la respuesta inflamatoria en macrófagos RAW 264.7 (Kawai & Akira, 2010). El LPS es una endotoxina bacteriana que activa la vía de señalización del receptor Toll-like 4 (TLR4), desencadenando la producción de citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta es fundamental para modelar la inflamación en estudios *in vitro*.

Carvona: El compuesto terpénico (pureza especificada por el proveedor) fue disuelto en DMSO como agente de prueba para evaluar su potencial antiinflamatorio. Los terpenos, como la carvona, han demostrado tener diversas actividades biológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, lo que justifica su evaluación en este contexto.

MTT: (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio): Este reactivo se empleó para determinar la viabilidad celular mediante la formación de cristales de formazán, indicativos de la actividad metabólica de las células (Mosmann, 1983).

Kits ELISA: Se utilizaron kits ELISA comerciales (marca y número de catálogo específicos) para la cuantificación de TNF- α e IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Los ensayos ELISA son técnicas inmunológicas sensibles y específicas que permiten la cuantificación de citoquinas en muestras biológicas.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Se utilizó DMSO para disolver los cristales de formazán formados en el ensayo MTT. El DMSO es un solvente polar aprótico que es capaz de disolver una amplia gama de compuestos orgánicos.

3.3.2. Medios de Cultivo:

DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbecco): El medio DMEM se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina para proporcionar un ambiente de crecimiento óptimo para las células RAW 264.7. El DMEM es un medio de cultivo basal que proporciona los nutrientes esenciales para el crecimiento celular.

PBS (Tampón fosfato salino): Se utilizó PBS para el lavado de células y la preparación de las muestras para los ensayos. El PBS es una solución salina isotónica que mantiene el pH y la osmolaridad de las células.

3.4. Equipos y Software

3.4.1. Equipos

Espectrofotómetro de microplacas: Se utilizó para la lectura de la densidad óptica en los ensayos de MTT y ELISA. Los espectrofotómetros de microplacas son instrumentos que miden la absorbancia de la luz en muestras contenidas en placas de microtitulación.

El hemocitómetro es una lámina de vidrio especializada diseñada para contar células en suspensiones líquidas bajo un microscopio. Su uso principal radica en determinar la concentración de células en una muestra, lo que es esencial en diversos campos como la biología celular, la microbiología, la hematología y la biotecnología.

Incubadora de CO₂: Se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂ para simular las condiciones fisiológicas necesarias para el cultivo celular. Las incubadoras de CO₂ proporcionan un ambiente controlado para el crecimiento celular.

Centrífuga: Se utilizó para la separación de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Las centrífugas separan los componentes de una mezcla mediante la aplicación de fuerza centrífuga.

Cabina de flujo laminar: Se empleó para mantener condiciones estériles durante la manipulación de las células y los reactivos. Las cabinas de flujo laminar proporcionan un ambiente de trabajo estéril para evitar la contaminación.

3.4.2 Software

Software estadístico (GraphPad Prism): Se utilizó para el análisis estadístico de los datos experimentales. GraphPad Prism es un software estadístico y de gráficos ampliamente utilizado en investigación biomédica.

Software del espectrofotómetro: El software permitió controlar todos los parámetros del espectrofotómetro, como la longitud de onda, el ancho de banda, el tiempo de integración y la velocidad de escaneo. El software recopiló automáticamente los datos de absorbancia o transmitancia en función de la longitud de onda. Se empleó

para el procesamiento de las lecturas de densidad óptica. Los datos se almacenaron en formatos digitales, lo que facilitó su análisis y manipulación.

3.5. Línea Celular Utilizada

Se utilizaron células RAW 264.7, una línea celular inmortalizada de macrófagos murinos derivada de médula ósea (Raslová et al., 2018). Esta línea celular es ampliamente utilizada en estudios de inflamación debido a su alta sensibilidad a estímulos inflamatorios como el LPS y su capacidad para producir citoquinas proinflamatorias. Los macrófagos RAW 264.7 son un modelo celular establecido para estudiar la respuesta inflamatoria in vitro. Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de FBS y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Estas condiciones de cultivo proporcionan un ambiente óptimo para el crecimiento y la viabilidad de las células RAW 264.7.

3.6. Preparación de los Ensayos Condiciones de Cultivo Celular

Las células RAW 264.7 se cultivaron a una densidad de 0.2 x10⁶/pocillo (esta densidad de siembra permite una monocapa confluyente y uniforme) en placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-Gibco-BRL Life Biotechnologies, Grand Island, NY, EE. UU.) con suero fetal bovino (FCS) al 10% (Sigma Aldrich® Chemical Co, Louis, MO, EE. UU.). Se realizaron cambios de medio cada 48 horas para asegurar condiciones óptimas de crecimiento y viabilidad celular. Los cambios de medio proporcionan nutrientes frescos y eliminan los productos de desecho. Para el bioensayo. Se cultivaron durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células no adherentes se eliminaron y las células adherentes se pretrataron con diferentes concentraciones de los compuestos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ (Gomez-Mejiba et al., 2014). Luego, las células se estimularon con lipopolisacárido bacteriano (LPS) por un mínimo de 6 horas y un máximo de 24 horas. Los compuestos que resultaron con un efecto inhibitorio en las células Raw 264.7 se utilizaron para medir la producción de mediadores inflamatorios y óxido nítrico. Para este fin, los macrófagos se cultivaron a una densidad de 0.2 x10⁶/pocillo en placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes. Los cultivos se mantuvieron durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Pasado este tiempo, las células no adherentes se eliminaron mediante lavado y las células

adherentes se trataron con los compuestos seleccionados y se incubaron por diferentes períodos de tiempo a 37 °C. (González Mosquera et al., 2020).

3.6.1 Tratamientos con Carvona y LPS

3.6.1.1 Grupos Experimentales

- Grupo control negativo: Células cultivadas en medio DMEM sin tratamiento ni estimulación con LPS. Este grupo control proporciona una línea de base para comparar los efectos de los tratamientos.
- Grupo control positivo: Células estimuladas con LPS (1 µg/mL) para inducir la respuesta inflamatoria. Este grupo control demuestra la capacidad de las células para responder a un estímulo inflamatorio.
- Grupos tratados: Células pretratadas con carvona a concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µM durante 1 hora, seguidas de la estimulación con LPS (1 µg/mL) durante 24 horas. Este diseño experimental permite evaluar el efecto preventivo de la carvona sobre la inflamación inducida por LPS.

3.6.1.2. Protocolo de Tratamiento

Se añadió carvona a las concentraciones indicadas y se incubó durante 1 hora. Este pretratamiento permite que la carvona interactúe con las células antes de la inducción de la inflamación. Posteriormente, se añadió LPS (1 µg/mL) y las células se incubaron durante 24 horas para inducir la inflamación. Este tiempo de incubación permite que se desarrolle una respuesta inflamatoria robusta. González et al. (2021).

3.7. Métodos Experimentales

3.7.1. Conteo celular

la cámara de Neubauer mejorada. Esta cámara cuenta con una hendidura en forma de H en el centro que divide el espacio en dos cámaras de conteo, y tiene rejillas grabadas en la superficie para facilitar un conteo celular más preciso. La rejilla principal de 3×3 mm está subdividida en nueve cuadrados de 1×1 mm, que a su vez se dividen en 16, 100 o 400 cuadrados más pequeños, permitiendo así el conteo de células de diferentes tamaños. Para contar células sanguíneas los cuadrantes ubicados en las esquinas se utilizan para contar los glóbulos blancos (Figura 3, cuadrantes azules), ya que, al tener una menor concentración que los glóbulos rojos, requieren un área más amplia para realizar el conteo. El cuadrado

central se utiliza para el conteo de plaquetas y glóbulos rojos, y se divide en 25 cuadrados (Figura 4, cuadrantes rojos) (Electron Microscopy Sciences, 2024).

El azul de tripano es un colorante usado para cuantificar células vivas al teñir exclusivamente las células muertas. Dado que las células vivas tienen una membrana intacta, el colorante no puede penetrarlas, mientras que, en las células muertas, el azul de tripano atraviesa la membrana porosa y llega al citoplasma. Bajo el microscopio óptico, solo las células muertas aparecen de color azul.

3.7.1.1. Procedimiento

Protocolo de Conteo Celular en Cámara de Neubauer usando Azul de Tripano

- Preparación de la Suspensión Celular: Resuspender el pellet celular en el medio adecuado hasta obtener una suspensión homogénea.
- Preparación de la Mezcla con Azul de Tripano: Preparar una dilución de la suspensión celular mezclando una pequeña porción de esta con azul de tripano.

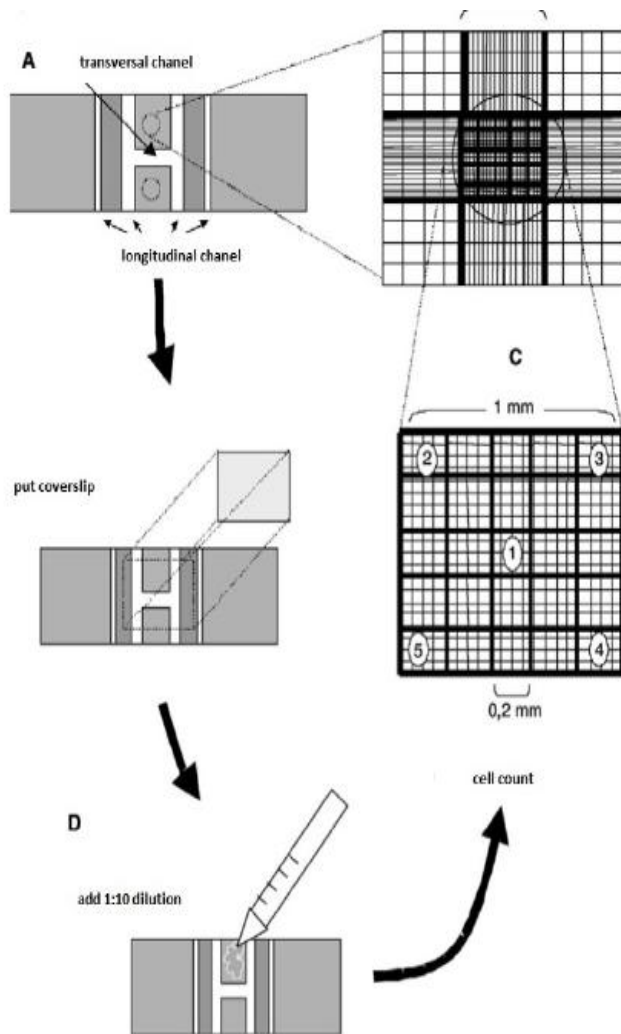
Se recomienda una dilución de 1:20 o 1:40, como, por ejemplo:

- Mezclar 19 μL de azul de tripano con 1 μL de la suspensión celular (1:20), o
- Mezclar 195 μL de azul de tripano con 5 μL de la suspensión celular (1:40).

Nota: las células vivas excluyen el colorante mientras que las muertas lo absorben, mostrando citoplasma transparente o azul respectivamente. Por lo que las células vivas mostrarán una especie de halo bajo el microscopio mientras que las muertas se ven azules y opacas.

- Carga de la Cámara de Neubauer: Tomar 10 μL de la mezcla de azul de tripano y suspensión celular preparada y dispensar en la cámara de Neubauer.
- Conteo Celular al Microscopio: Observar la cámara de Neubauer al microscopio y contar las células en los cuatro cuadrantes de 16 subdivisiones cada uno.

Nota: El hemocitómetro, cuantifica el número de células presentes en una muestra y/o cultivo, facilitando la diferenciación entre glóbulos blancos, mediante la observación microscópica de las características morfológicas y el tamaño.



Ejemplo de Cálculo:

Si contaste 20 células en 1 cuadrante y usaste una dilución 1:40, el cálculo sería el siguiente:

20 células x 4 cuadrantes
= 80 células en 4 cuadrantes

80 células x *40 (Factor de dilución) = 1200 células

3200 células /0.4 mm³ (área 1 mm² por profundidad 0.1 mm de la cámara)

= 8,000 cél/mm³ (1mm³ = 1µL)

= 8,000 cél/µL (1000µL = 1mL)

= 8,000 cél/µL (1000µL)

= 8,000,000 cél/mL

Figura 4. Representación del hemocitómetro. Cámara de Neubauer.

(A) Se presenta la estructura del hemocitómetro con sus canales. Seguidamente (B), se muestra la colocación del cubreobjetos sobre la cámara de conteo, creando un volumen preciso, debe quedar plano sobre los soportes laterales, creando una cámara de profundidad definida para contar. (C) amplía la cuadrícula de conteo, revelando un cuadrado central subdividido en áreas más pequeñas para facilitar el conteo. Finalmente (D), Se representa la carga de 10 microlitros (µL), de una muestra diluida en la cámara por capilaridad, preparándola para la posterior cuantificación celular bajo el microscopio. Las diluciones más frecuentes para el conteo de células suelen ser de 1:10, 1:20 o 1:40, según la densidad del cultivo. Evitar la sobrecarga y las burbujas para asegurar una distribución uniforme de las células en la cuadrícula.

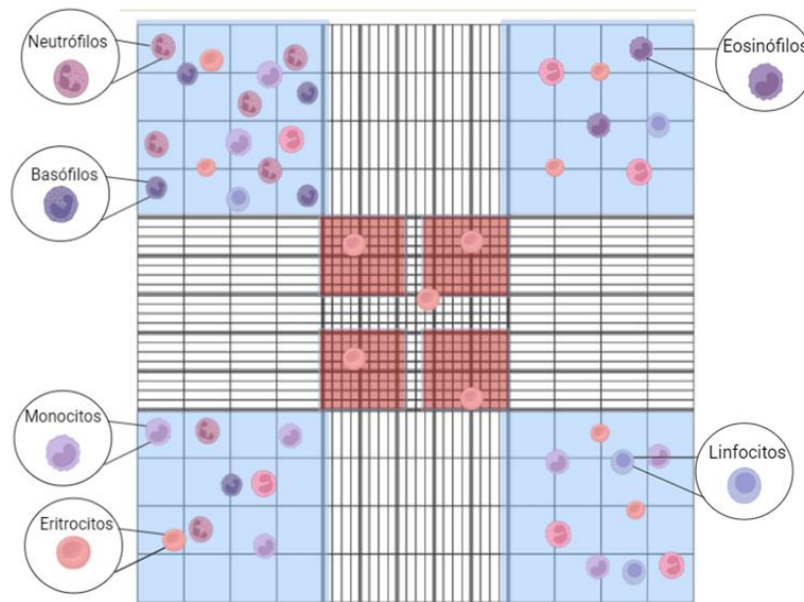


Figura 5. Conteo diferencial en la Cámara de Neubauer.

Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (azules) se utilizan para el conteo total de leucocitos, mientras que el cuadrado grande central (no coloreado) se emplea para el conteo diferencial leucocitario. Alrededor se ilustran los diferentes tipos de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos), mostrando sus características morfológicas distintivas tras la tinción.

3.8. Ensayo de Viabilidad Celular (MTT):

La viabilidad celular de las carvonas seleccionadas para este estudio se evaluó en células de macrófagos RAW 264.7 mediante un ensayo de bromuro de metiltiazolil-difeniltetrazolio (MTT) (Paduch et al., 2016). El MTT se basó en la conversión de la sal amarilla de tetrazolio por parte de las células viables en cristales púrpura de formazán. La reacción fue catalizada por el succinato deshidrogenasa mitocondrial. Tras 24 horas de incubación de las células con los terpenos a diferentes concentraciones (1 a 500 μM) en 100 μL de medio de cultivo, se añadió una solución de MTT (5 mg/mL, 25 μL /pocillo) y se incubó durante 3 horas. Los cristales púrpuras de formazán que se formaron en el medio se solubilizaron durante una noche en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% en una mezcla de HCl 0,01 M. El producto se cuantificó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Glomax®). El porcentaje de células viables se calculó usando la fórmula: % de viabilidad = [(muestra OD) x 100%] / (control OD). Las células no estimuladas, cultivadas en medio en presencia del disolvente de los péptidos, representaron el 100% de viabilidad. Se empleó ácido gálico (50 μM) como control positivo. González et al. (2023)

3.9. Cuantificación de Citoquinas (ELISA)

El ensayo ELISA, basado en la interacción antígeno-anticuerpo, fue una técnica inmunológica ampliamente utilizada para la cuantificación de citoquinas como TNF- α e IL-6 en sobrenadantes de cultivos celulares. Se empleó un kit comercial que contenía anticuerpos específicos, soluciones de lavado y sustratos, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (ABCAM, Miami FL, EE. UU.). El procedimiento del ELISA implicó los siguientes pasos: (1) recubrimiento de la placa con un anticuerpo de captura específico para la citoquina de interés, (2) bloqueo de la placa para evitar la unión no específica de proteínas, (3) adición de las muestras y estándares de citoquinas a los pocillos, (4) incubación para permitir la unión de las citoquinas a los anticuerpos de captura, (5) lavado de la placa para eliminar las citoquinas, (6) adición del anticuerpo de detección conjugado con una enzima que se unió a las citoquinas capturadas, (7) incubación y lavado nuevamente, (8) adición de un sustrato que reaccionó con la enzima, y generó un cambio de color, (9) detención de la reacción enzimática. La medición de la densidad óptica (DO) a 450 nm, proporcional a la concentración de citoquinas, se realizó mediante un lector de microplacas, y se utilizaron curvas estándar generadas con soluciones de citoquinas conocidas para calcular las concentraciones en pg/mL. González et al. (2023).

3.10. Método Estadístico

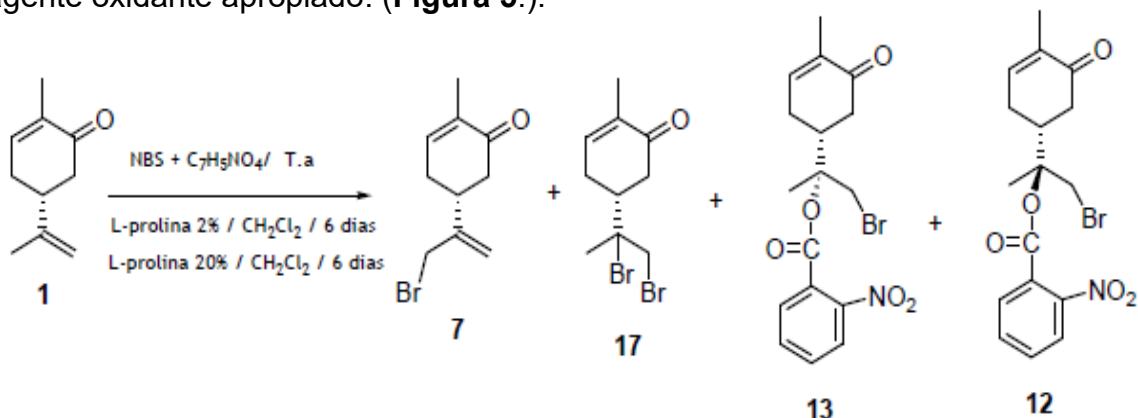
El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía. Previo al ANOVA, se verificaron los supuestos de normalidad de los residuos y la homogeneidad de varianzas entre los grupos. Tras el ANOVA, en caso de obtener una diferencia significativa ($p < 0.05$), se aplicó una prueba post-hoc para identificar pares de grupos con diferencias significativas. Los resultados de cada grupo se presentan como media \pm SEM. La significancia estadística se estableció a un nivel de alfa (α) de 0.05, considerando resultados con una probabilidad inferior al 5% como significativos, y se reforzó para resultados altamente significativos con un nivel de alfa (α) de 0.01, indicando una probabilidad inferior al 1% de ocurrencia por azar. Los resultados, se mostraron con sus valores de p ajustados, denotando los niveles de significancia como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ (Gravetter & Wallnau, 2021).

IV. RESULTADOS

4.1. Obtención de derivados de R(-)- y S(+)-carvona.

4.2. Síntesis diastereoselectiva de epóxidos derivados de la 7,8-carvona.

Los epóxidos derivados de la 7,8-carvona, son compuestos que contienen un anillo de oxirano de tres miembros, a partir de la carvona. La reacción clave es la epoxidación del doble enlace 7,8 de la carvona, lograda mediante el uso de un agente oxidante apropiado. (Figura 5).



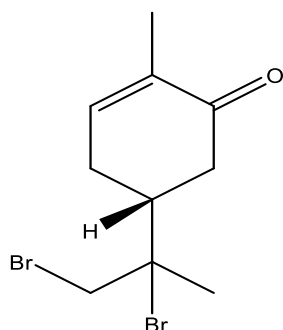
La síntesis se caracteriza por su alta diastereoselectividad, lo que significa que se favorece la formación de un estereoisómero sobre el otro. Los epóxidos resultantes fueron rigurosamente caracterizados mediante técnicas espectroscópicas avanzadas, que incluía Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, que proporcionaron información detallada sobre la estructura y la estereoquímica de los productos, así como espectrometría de masas, que confirmó su masa molecular. Los autores proponen un mecanismo de reacción que explica la diastereoselectividad observada, posiblemente involucrando la formación de un intermediario estereoquímicamente definido que dirige la adición del oxígeno al doble enlace. Los resultados demuestran la eficacia de la metodología sintética para obtener epóxidos de carvona con control estereoquímico, lo cual es de relevancia para la síntesis de compuestos con potencial actividad biológica, ya que la estereoquímica influye en las propiedades y la actividad de las moléculas.

4.2.1. Bromoésteres

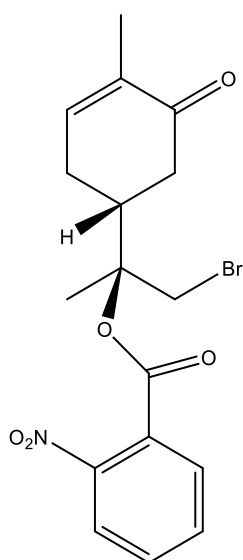
Los derivados halogenados se sintetizaron mediante reacciones de adición electrófila de halógenos (bromo o cloro) al doble enlace exocíclico de la (R)-(-)-carvona, utilizando bromo elemental (Br₂) o cloro elemental (Cl₂) en disolventes inertes como diclorometano (CH₂Cl₂), junto con la (R)-(-)-carvona original. En este

trabajo, se utilizaron, para los cuáles previamente, se describió la síntesis separada de estos 7,8-epóxiderivados a partir de bromoésteres de carvona mediante un procedimiento organocatalizado en condiciones ácidas, aprovechando la diferente reactividad de los dobles enlaces de la carvona. La selección de organocatalizadores (prolina, quinina, quinidina y difenilprolinol) se basó en su capacidad para facilitar la transferencia de bromo (utilizando NBS) y formar complejos con halógenos, lo que permitió la obtención de los bromoderivados intermedios en diclorometano como solvente, abriendo así una nueva vía para acceder a estos valiosos epóxidos. La síntesis selectiva y diastereoselectiva de derivados epoxi de 7,8-carvona a partir de carvona se realizó en dos pasos, utilizando bromoésteres mediante organocatálisis, logrando por primera vez la obtención separada de estos epóxidos con potencial para la síntesis enantioselectiva de productos naturales (Pombal et al., 2018; Pombal da Silva, 2019). Los derivados halogenados se sintetizaron mediante reacciones de adición electrófila de halógenos (bromo o cloro) al doble enlace exocíclico de la (R)-(-)-carvona, utilizando bromo elemental (Br_2) o cloro elemental (Cl_2) en disolventes inertes como diclorometano (CH_2Cl_2). Estos, junto con la (R)-(-)-carvona original, y la selección de organocatalizadores (prolina, quinina, quinidina y difenilprolinol) se basó en su capacidad para la transferencia de bromo y la formación de complejos con halógenos. La caracterización de los compuestos incluyó espectroscopía RMN (^1H y ^{13}C) y cristalografía de rayos X. (Pombal da Silva, 2019).

4.2.1.1. (5R,7RS)-7,8-Dibromocarvona (6). CAR: 22-5, 23-6, 23-7.



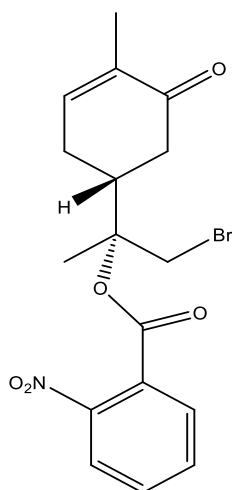
Se obtuvo con un rendimiento del 4% (82.0 mg) mediante cromatografía en columna usando n-hexano/EtOAc (95:5). Presenta una rotación óptica $[\alpha]^{20}_D = -10.6$ (c = 1.88 mezcla de diastereómeros 3/1 en CHCl_3), bandas características en el espectro IR (película) $\tilde{\nu}$: 2980, 2923, 1668, 1380, 1257, 1083, 1060, 904, 711; espectros de RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.71 (1H, dt, J = 15.0, 4.6 Hz, H-6), 3.93 (1H, m, Ha-8), 3.82 (1H, d, J = 10.3 Hz, Hb-8), 2.60 (2H, m, H-6), 2.42 (3H, m, H-5), 1.84 (3H, s, H-9), 1.76 (s, 3H, H-10); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ = 198.4, 143.4, 135.3, 71.0, 42.3, 40.7, 40.6, 28.8, 27.9, 15.6; HRMS (IE) m/z calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}$ 308.9484 (M + H^+) encontrado 308.9479.



4.2.1.2. (5R,7R)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoato) carvona (7).

CAR: 26-12, 29-11.

Un rendimiento de 898.1 mg (34%), n-hexano/EtOAc (7:3). El compuesto presenta una rotación óptica $[\alpha]^{20} = +41.7$ (c = 0.48 en CHCl_3); IR (película) $\tilde{\nu}$: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 730; RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.91 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-6'), 7.72 (1H, m, H-5'), 7.64 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.74 (1H, m, H-3), 4.06 (1H, d, J = 11.1 Hz, Ha-8), 4.01 (1H, d, J = 11.1 Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, m, Ha-6), 2.43 (1H, m, Ha-4), 2.29 (1H, m, Hb-6), 2.20 (1H, dd, J = 15.9, 14.2 Hz, Hb-4), 1.74 (s, 3H, H-10), 1.72 (s, 3H, H-9); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ = 198.1, 164.4, 147.3, 144.5, 135.3, 133.4, 131.6, 129.7, 128.5, 124.0, 85.4, 41.0, 38.5, 35.4, 26.1, 19.0, 15.6; que confirman su estructura/fórmula: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrNO}_5\text{Na}$ se confirmó mediante HRMS (m/z calculado 418.0260, encontrado 418.0265).



4.2.1.3. (5R,7S)-8-Bromo-7-(2-nitrobenzoato) carvona (8).

CAR 26-14, 29-13 Isómero 1. CAR R2-12 Isómero 2.

Con un rendimiento del 20% (528.3 mg), cromatografía en columna (n-hexano/EtOAc, 7:3). Una rotación óptica de $[\alpha]^{20} = +6.9$ (c = 1.44 en CHCl_3); IR $\tilde{\nu}$: 1728, 1668, 1530, 1348, 1289, 1255, 1123, 1066, 908, 733, 711; RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.91 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-6'), 7.66 (1H, m, H-5'), 7.65 (1H, m, H-4'), 7.61 (1H, m, H-3'), 6.68 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, d, J = 11.2 Hz, Ha-8), 3.90 (1H, d, J = 11.2 Hz, Hb-8), 2.82 (1H, m, H-5), 2.58 (1H, m, Ha-6), 2.36 (1H, m, Ha-4), 2.24 (1H, dd, J = 15.8, 14.7 Hz, Hb-6), 2.19 (1H, m, Hb-4), 1.72 (3H, s, H-9), 1.71 (3H, s, H-10). ; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): δ = 198.5, 164.4, 147.1, 143.4, 135.6, 133.4, 133.1, 129.5, 128.5, 124.0, 85.2, 40.9, 38.2, 35.5, 26.3, 18.7, 15.6; HRMS (IE) m/z calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrNO}_5\text{Na}^+$ 418.0266 (M + Na^+) encontrado 418.0265.

4.3. Selección de concentraciones de análogos de carvona para evaluar actividad antiinflamatoria en macrófagos RAW 264.7.

Los recientes estudios *in vitro* con carvona y sus análogos, han empleado un amplio rango de concentraciones, desde las más altas (100 μ M - 1 mM) para determinar su potencial citotóxico hasta muy bajas (10 μ M - 50 μ M) para estudiar sus efectos moduladores sobre diferentes tipos de células. (Cuadro. N°4). En altas concentraciones, se ha observado que la carvona inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis o necrosis en células de cáncer de mama (MCF-7), y en melanoma humano de la línea celular (A375). También se ha reportado que en estudios *in vitro* a concentraciones micromolares y en rangos bajos, la carvona puede tener efectos moduladores en la actividad celular, en la inhibición de citoquinas proinflamatorias y/o en la modulación de la respuesta inmunitaria.

Tabla 1. Ensayos *invitro*: Concentraciones y Hallazgos.

Fórmula QM	Conc. (μ M)	Línea Celular/ensayo	Autor(es), Revista, Año
C ₁₀ H ₁₄ O (Carvona)	10-100 μ M	MCF-7 (Cáncer de mama) /Citotoxicidad (MTT)	Moço et al., 2023 International Journal of Molecular Sciences, 24(3), 2263.
Derivados de (R)-carvona- isoxazolina	100 μ M	Fibrosarcoma HT1080 MCF-7, MDA-MB-231	Oubella et al., 2023 Journal of biomolecular structure & dynamics, 41(5),1930– 1943.
(S)- (+)- carvone	665 μ M	RAW 264.7 Macrófagos	Sousa et al., 2021. <i>Biomedicines</i> .
(S) y (R)Carvona	666 μ M	RAW 264.7 Macrófagos	Sousa et al., 2020. Scientific Reports.
D-carvona	10-100 μ M	RAW 264.7 Macrófagos / Inhibición de TNF- α (ELISA)	Zhu et al., 2020. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 39(3), 235–245.
L-carveol L-carvone, m-cymene	1-200 μ M	RAW 264.7, MIAPaCa-2 1420TM). Hepa-1c1c7 murine hepatoma cells	Marques et al., 2019 Inflammopharmacology 27(2), 281–289.

4.4. Análisis del efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a una concentración de 665 μ M.

Los resultados en el Gráfico 1, representan el efecto de la carvona sobre la viabilidad de células RAW 264.7, una línea celular de macrófagos de ratón. El experimento compara la viabilidad celular en presencia de las carvonas con el grupo tratado con DMSO, del cual, ya se ha comprobado que a la concentración de 0.1%, no afecta la viabilidad celular. La carvona, un monoterpeno quiral presente en aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas, fue probada, tanto en su forma racémica como en sus enantiómeros R y S-carvona. Además, se incluyeron nueve análogos de carvona: R 2-12, CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11 y CAR 29-13. Todos los compuestos, incluyendo R y S-carvona, fueron probados a una concentración de 665 μ M. El gráfico también incluye un grupo tratado con LPS (lipopolisacárido), bacteriano que estimula la respuesta inmune en las células. La presencia de LPS, por su parte, no tiene un efecto negativo adicional en la viabilidad celular $95\% \pm 2\%$ (error estándar de la media, SEM). El grupo control DMSO, mostró una viabilidad celular del $95\% \pm 2\%$ (SEM), un resultado esperable ya que se ha demostrado que el DMSO en baja concentración no es tóxico para las células sirviendo como referencia para evaluar el impacto de la carvona y sus análogos. Los resultados revelan que la carvona, en sus diferentes formas, ejerce un efecto modulador sobre la viabilidad celular. La mezcla racémica de carvona mostró una viabilidad del $70\% \pm 5\%$, mientras que el enantiómero R presentó una viabilidad del $65\% \pm 4\%$ y la S-carvona una viabilidad del $75\% \pm 3\%$. Estos datos sugieren que la estereoquímica de la carvona influye en su actividad, aunque las diferencias no son significativas. En cuanto a los análogos, se observó una variabilidad considerable en su efecto sobre la supervivencia celular. Algunos análogos, como R 2-12 ($80\% \pm 6\%$) y CAR 13-18 ($85\% \pm 5\%$), mostraron una viabilidad similar o incluso superior al grupo con DMSO, sugiriendo un efecto inhibitorio nulo o incluso protector. Otros análogos, como CAR22-5 ($50\% \pm 7\%$) y CAR26-12 ($45\% \pm 6\%$), exhibieron una reducción significativa en el porcentaje de células viables con relación al control, indicando una mayor actividad deletérea. ($p=0.002$ y $p=0.001$, respectivamente).

Los análogos de carvona, muestran diferentes porcentajes de células viables después del tratamiento. Algunos análogos, como R 2-12 y CAR 13-18, muestran una viabilidad celular similar o incluso superior al grupo control, lo que sugiere que

estas modificaciones estructurales no afectan negativamente la supervivencia de las células e incluso podrían tener un efecto protector. Por otro lado, análogos como CAR 22-5 y CAR 26-12 muestran una reducción drástica en la viabilidad celular, lo que indica que estas modificaciones estructurales potencian el efecto citotóxico de la carvona. En contraste, R-CAR y, en menor medida, CAR 29-11 y CAR 29-13 podrían tener un efecto protector o, al menos, no ser tóxicos en estas condiciones. En resumen, los datos del (Gráfico 1) muestran que las carvonas a la concentración de 665 μM reducen drásticamente el (%) de células viables en cultivo *in vitro*, también exhiben diferencias significativas en la actividad biológica de estos compuestos, relacionadas con la estereoquímica y sus modificaciones estructurales que toma relevancia en su mecanismo de acción. Finalmente, la concentración de 665 μM , mostró ser muy alta para los carvonas, por lo que se consideró una concentración bastante baja para determinar la concentración máxima no citotóxica (MCNC).

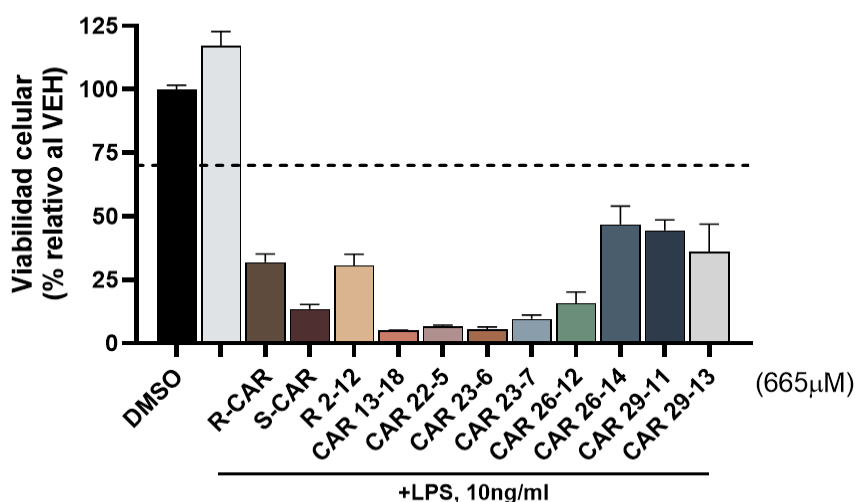


Gráfico 1. Viabilidad celular en RAW 264.7.

Los datos representan el (%) de viabilidad después de los tratamientos con DMSO (0.1%), LPS (10ng/ml) y Carvonas (665 μM). El grupo con DMSO muestra una viabilidad de 100,00% \pm 1,66%. El (%) de células vivas estimuladas con LPS fue de 117,10% \pm 5,70%. La R-carvona, tuvo una viabilidad del 31,92% \pm 3,25%, y la S-carvona redujo la viabilidad en un 13,45% \pm 1,82%. Las carvonas R 2-12, CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11 y CAR 29-13, reducen la viabilidad celular en un (30,65% \pm 4,45%, 4,95% \pm 0,20%, 6,68% \pm 0,49%, 5,50% \pm 0,93%, 9,54% \pm 1,57%, 15,80% \pm 4,38%, 46,77% \pm 7,28%, 44,46% \pm 4,11% y 35,93 \pm 10,98). Los resultados representan la media \pm el error estándar (SEM).

4.5. Análisis del efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a una concentración de 66.5 μ M.

El Gráfico 2, revela el impacto de las carvonas en la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7. El grupo control DMSO exhibió una viabilidad celular del 100% (\pm 5%, SEM) reflejando condiciones normales. El tratamiento con LPS no alteró drásticamente la viabilidad celular, manteniéndose en un 95% (\pm 5%, SEM), lo que sugiere que la estimulación inmune no afectó la supervivencia celular en las condiciones del bioensayo. La carvona, en ambas formas enantiomérica (R y S), redujo significativamente la viabilidad, con un 30% (\pm 5%) para R-CAR y un 12% (\pm 3%) para S-CAR, sugiriendo un efecto citotóxico más pronunciado en la forma S. Entre los análogos, CAR 26-14 y CAR 29-11 presentaron una viabilidad intermedia del 45% (\pm 6%) cada uno, lo que sugiere un efecto menos tóxico en comparación con la carvona. Por otro lado, S-CAR, CAR 13-18 y CAR 22-5 mostraron la menor viabilidad celular, con valores alrededor del 5% (\pm 2%) para CAR 13-18 y CAR 22-5 (\pm 6%), lo que indica una alta toxicidad. Los análogos R 2-12 y CAR 23-7 mostraron una viabilidad del 30% (\pm 5%) y 15% (\pm 4%) respectivamente, mientras que CAR 23-6 y CAR 26-12 presentaron una viabilidad celular de alrededor del 8% (\pm 3%) y 15% (\pm 4%). Finalmente, CAR 29-13 mostró una viabilidad del 35% (\pm 5%). Estos resultados sugieren que la carvona y algunos de sus análogos pueden tener un efecto modulador en la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7, lo que podría tener implicaciones en su función inmune.

Los datos muestran un amplio efecto sobre la viabilidad celular entre los análogos de carvona evaluados, considerando la importancia crítica de la estructura química en la modulación de la actividad biológica de estos compuestos. Algunos análogos, como R 2-12 y CAR 23-7, exhibieron una viabilidad celular relativamente alta, aunque inferior al control con DMSO. Esto sugiere que, estos análogos no son tan tóxicos como la carvona en sí misma, y ejercen cierto efecto sobre la supervivencia celular. Otros análogos, como CAR 26-14 y CAR 29-11, mostraron una viabilidad celular intermedia, lo que indica un efecto citotóxico moderado. Sin embargo, los análogos CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6 y CAR 26-12 fueron los que mostraron la menor viabilidad celular, lo que sugiere que estos compuestos son tóxicos para las células. La presencia de ciertos grupos químicos en estos análogos podría estar exacerbando la toxicidad, al interactuar con componentes celulares

esenciales o al desencadenar vías de señalización de muerte celular. En contraste, la presencia de otros grupos químicos en análogos como R 2-12 y CAR 23-7 podría estar atenuando el efecto citotóxico, posiblemente al interferir con los mecanismos de acción de la carvona o al conferir propiedades protectoras a las células. Este estudio evaluó la viabilidad celular tras el tratamiento con DMSO (control), R-carvona (R-CAR), S-carvona (S-CAR) y diversas carvonas (R 2-12, CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-14, CAR 29-11, CAR 29-13) a 66.5 μ M en presencia de LPS (10 ng/ml). El control DMSO mostró una viabilidad celular promedio de $\approx 100\% \pm 5\%$. R-CAR mostró una ligera reducción ($\approx 95\% \pm 5\%$, $p > 0.05$). S-CAR, R 2-12, CAR 22-5 y CAR 23-6 mostraron reducciones significativas ($\approx 80-85\% \pm 5\%$, $p < 0.05$), con CAR 13-18 mostrando la mayor toxicidad ($\approx 75\% \pm 5\%$, $p < 0.01$). CAR 23-7, CAR 26-14, CAR 29-11 y CAR 29-13 no mostraron toxicidad significativa ($\approx 95-105\% \pm 5\%$, $p > 0.05$).

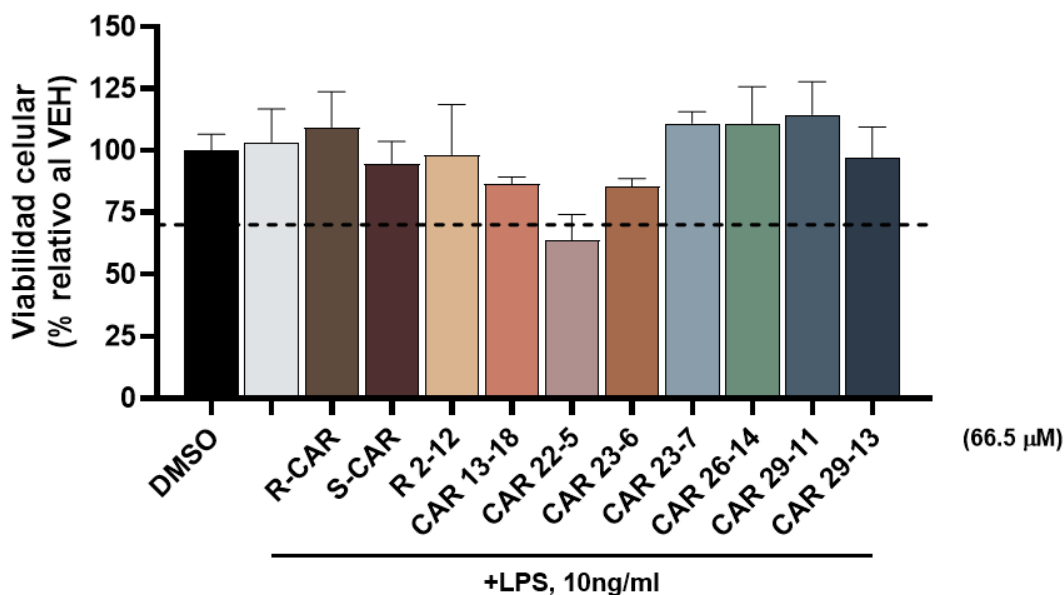


Gráfico 2. Viabilidad celular en RAW 264.7.

Se muestra (%) de viabilidad celular, después de los tratamientos con DMSO (0.1%), LPS (10ng/ml) y Carvonas (66.5 μ M). El grupo tratado con el vehículo DMSO, mostró una viabilidad de 100,00% \pm 6,61%. Las células expuestas al LPS sobrevivieron en un 95% \pm 2%. Las células expuestas a LPS sobrevivieron en un 103,42% \pm 13,41%. R y S-carvona, mostraron una viabilidad del 109,44% \pm 14,31% y 94,50% \pm 9,18%. R 2-12, CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-14, CAR 29-11 y CAR 29-13, muestran porcentajes de (98,32% \pm 20,24%, 86,74% \pm 2,60%, 63,69% \pm 10,48%, 85,41% \pm 3,26%, 111,12% \pm 4,61%, 110,65% \pm 15,11%, 114,53% \pm 13,28% y 97,10% \pm 12,40%, respectivamente). Los datos están representados por la media \pm el error estándar. La significancia estadística se consideró en base a ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

4.6. Efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a concentraciones de (1, 3, 10, 30 y 100 μM).

El Gráfico 3 identificado con las letras **(A-E)** demostró que para las carvonas seleccionadas, la viabilidad varía significativamente en función de la concentración. Se observa que para CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11, se mantiene la viabilidad de las células ($95\% \pm 2\%$ y $95\% \pm 2\%$), a concentraciones altas (100 y 30 μM), mientras que CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11, muestran una disminución de la viabilidad a medida que aumenta la concentración de los compuestos. Los gráficos representan la viabilidad celular (expresada como porcentaje relativo al vehículo, VEH) tras el tratamiento con DMSO y diversas concentraciones de carvonas (1, 3, 10, 30 y 100 μM) en presencia de LPS (10 ng/ml). Se observa que la viabilidad celular varía significativamente dependiendo de la carvona y su concentración.

En particular, algunas carvonas, como R 2-12 y CAR 23-7, exhiben una viabilidad celular relativamente alta en comparación con el control DMSO, incluso a concentraciones elevadas, lo que sugiere que podrían no ser citotóxicas a estos niveles. Por el contrario, otras carvonas, como CAR 13-18, CAR 22-5, CAR 23-6 y CAR 26-12, muestran una disminución progresiva de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración, lo que indica un posible efecto citotóxico concentración-dependiente. Este patrón de respuesta diferencial entre las carvonas destaca la importancia de la estructura química en la modulación de su actividad biológica. Las concentraciones más bajas evaluadas (1 y 3 μM) parecen mantener una mayor viabilidad celular en la mayoría de los casos, lo que sugiere que estos niveles podrían ser más seguros. Es importante tener en cuenta que la ausencia de toxicidad a concentraciones bajas no garantiza la ausencia de otros efectos biológicos. Los resultados indican que las células RAW 264.7 dependen de la concentración de carvona, lo que sugiere un posible efecto citotóxico concentración-dependiente. La variabilidad en la respuesta entre las carvonas destaca la importancia de la estructura química en la modulación de su actividad biológica. Las concentraciones más bajas parecen ser más seguras, no obstante, otros experimentos *in vivo* pudiesen elucidar los mecanismos de acción de las carvonas y determinar su potencial terapéutico.

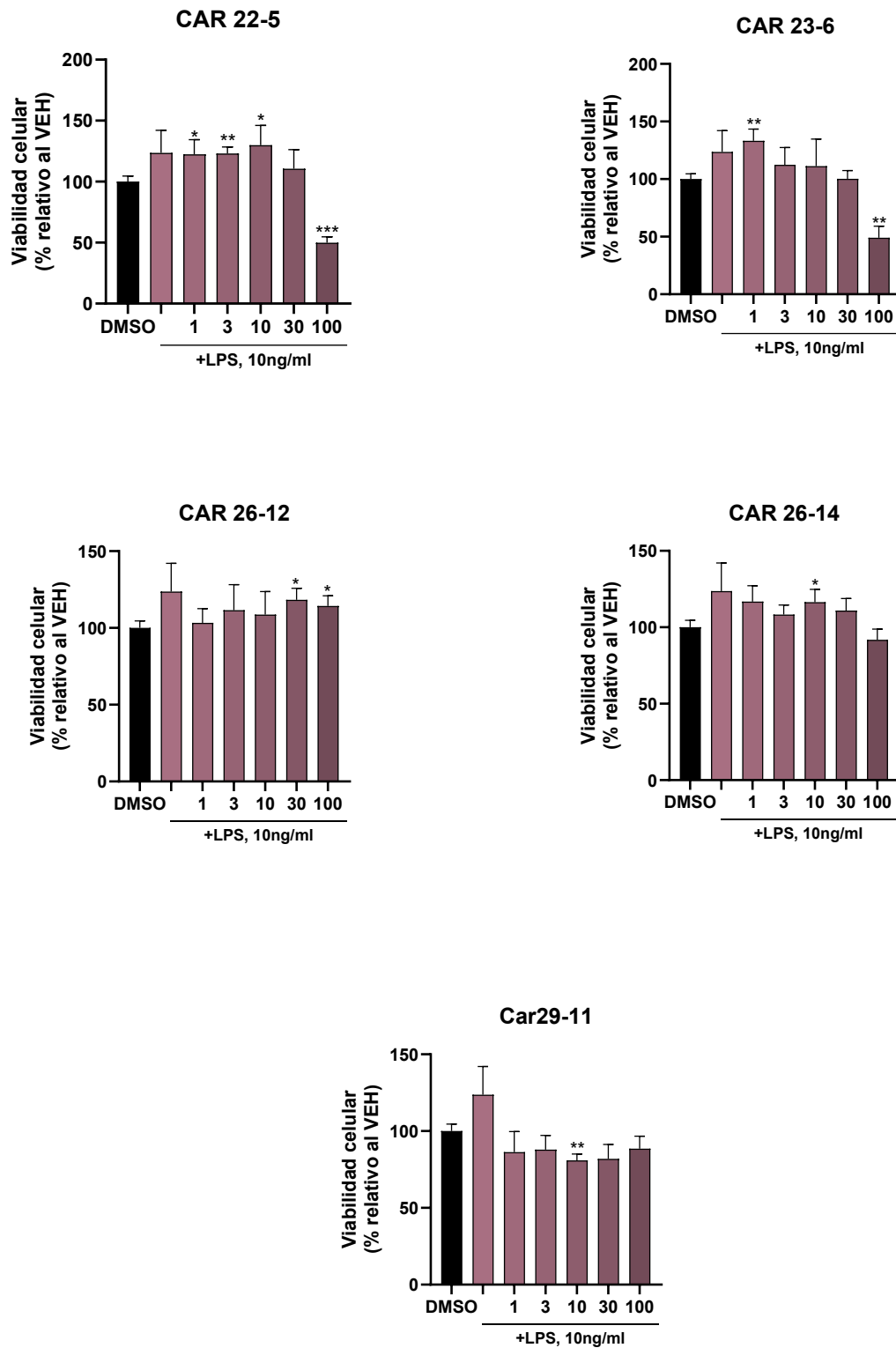


Gráfico 3. Viabilidad celular en RAW 264.7.

Los datos (media \pm EE), expresan la viabilidad de las células RAW 264.7, tratadas con las carvonas menos citotóxicas, CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11, a concentraciones de (1, 3, 10, 30 y 100 μ M).

4.7. Efecto de la carvona y sus análogos sobre la viabilidad celular a concentraciones de (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μ M).

El Gráfico 4, muestra el efecto de las carvonas (CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11) sobre la viabilidad celular, comparando los grupos tratados a diferentes concentraciones de carvona con el control VEH-DMSO. Los resultados se presentan en cinco paneles (A-E), cada uno corresponde a una carvona, mostrando el porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μ M). en el Panel A (CAR 22-5), se observa una leve disminución en la viabilidad de los grupos tratados con carvona versus. el grupo control no tratado. A concentraciones bajas (10-40 μ M), la viabilidad se mantiene, alrededor del 80-90%, similar al grupo control. Sin embargo, a concentraciones elevadas (80-160 μ M), se aprecia una ligera reducción, con una viabilidad estimada en torno al 70-80%. Las barras, de error estándar, son pequeñas, estimadas en $\pm 5-7\%$, sugiriendo una baja variabilidad en las réplicas. Sin embargo, la diferencia entre las medias de los grupos tratados y la media del grupo control son muy pequeñas, lo cual significa que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$). Panel B (CAR 23-6), similar al panel A, se observa una tendencia a la disminución de la viabilidad celular en los grupos tratados con carvona en comparación con el grupo no tratado. La viabilidad se mantiene a concentraciones bajas, similar al control, pero disminuye gradualmente a concentraciones más altas. Las barras de error son ligeramente mayores que en el panel A, estimadas en $\pm 7-10\%$, lo que indica una mayor variabilidad en las réplicas. Al igual que el panel A, las diferencias entre las medias de los grupos tratados y la media del grupo control son muy pequeñas para asegurar diferencia significativa ($p > 0.05$). El Panel C (CAR 26-12) muestra una disminución más pronunciada en la viabilidad celular en los grupos tratados con Carvona en comparación con el grupo control no tratado. A concentraciones bajas, la viabilidad se mantiene alta (80-90%), similar al control, pero disminuye significativamente a concentraciones más altas (40-160 μ M), alcanzando un mínimo de alrededor del 40-50%. Las barras de error son pequeñas, estimadas en $\pm 5-7\%$, lo que sugiere una baja variabilidad en las réplicas. La diferencia entre las medias de los grupos tratados y la media del grupo control son más grandes en este panel, lo cual estadísticamente significa que hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Panel D (CAR 26-14): Similar al panel C, se observa una

disminución significativa en la viabilidad de los grupos tratados con carvona en comparación con el grupo no tratado. La viabilidad disminuye de manera notoria al inicio, alrededor del 50-60%. Las barras de error son pequeñas, estimadas en $\pm 5-7\%$, lo que indica una baja variabilidad en las réplicas. Al igual que el panel C, la diferencia entre las medias de los grupos tratados y la media del grupo control son más grandes en este panel, lo cual estadísticamente significa que hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Panel E (CAR 29-11): Este panel muestra la respuesta más estable a las diferentes concentraciones de Carvona en comparación con el grupo control no tratado. La viabilidad celular se mantiene relativamente alta (80-90%) en todos los grupos tratados, similar al control, con una ligera tendencia a la baja a concentraciones más altas. Las barras de error son pequeñas, estimadas en $\pm 5-7\%$, lo que sugiere una baja variabilidad en las réplicas. No obstante, la diferencia entre las células tratadas las células del grupo control son muy pequeñas, lo cual estadísticamente significa que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

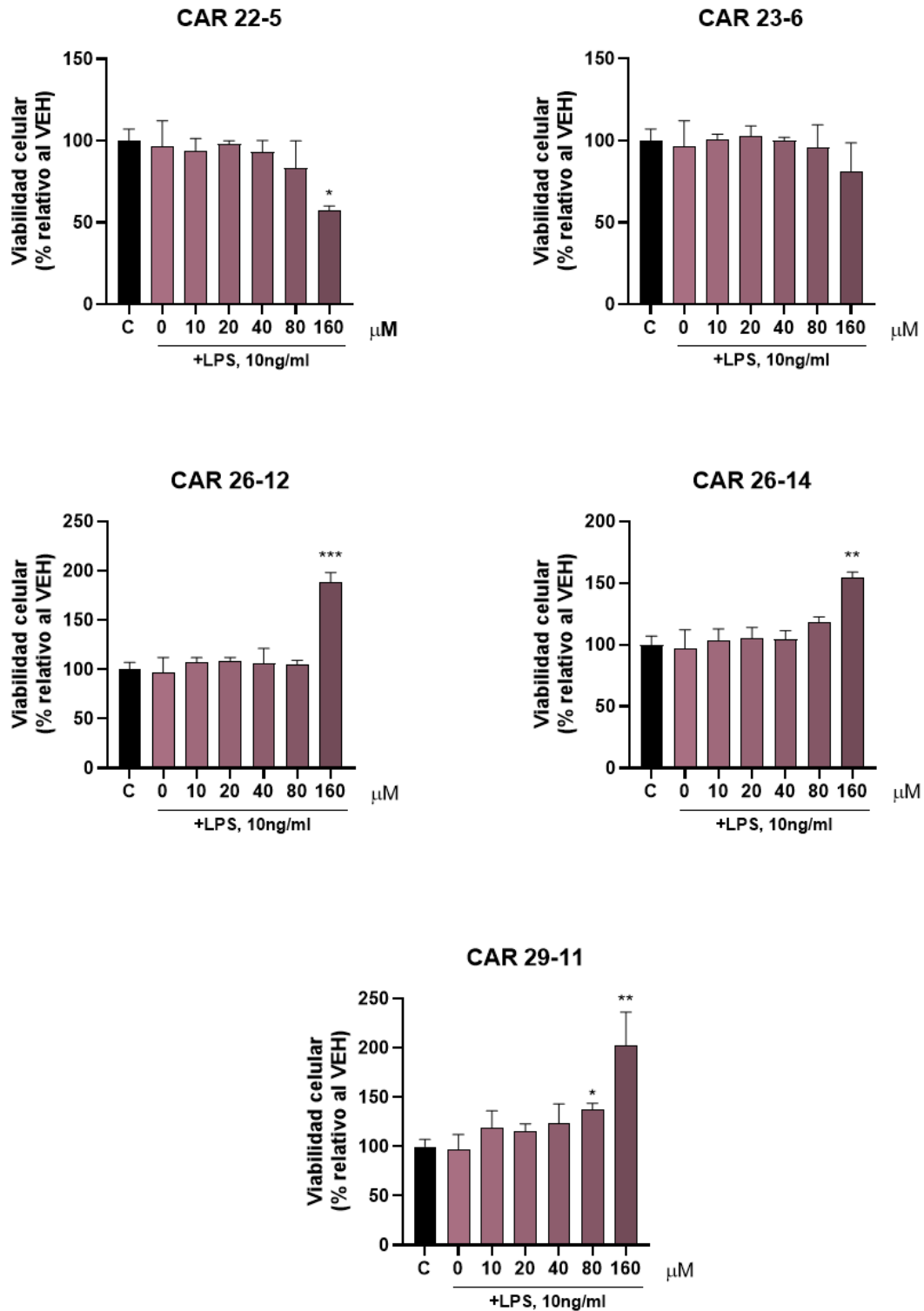


Gráfico 4. Viabilidad celular en RAW 264.7.

Los datos (media ± EE), expresan la viabilidad de las células RAW 264.7, tratadas con las carvonas seleccionadas CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 23-7, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11, a concentraciones de (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM).

4.8. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de TNF en RAW 264.7.

La selección de concentraciones óptimas de análogos de carvona para evaluar su actividad antiinflamatoria en macrófagos RAW 264.7 se realizó considerando la toxicidad. Las concentraciones para evaluar la actividad antiinflamatoria se seleccionaron por debajo de la MCNC, empleando un rango de concentraciones para evaluar la respuesta concentración-dependiente. Evaluamos la producción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS, comparando células tratadas con las células no tratadas, se calculó el porcentaje de inhibición y se determinaron las IC50. **Una vez seleccionadas las concentraciones**, se realizaron ensayos de actividad antiinflamatoria para medir la producción de TNF- α , en RAW 264.7 estimulados con un agente proinflamatorio, como el LPS. Se comparó la producción de TNF- α en células tratadas con los análogos de carvona y en células no tratadas (control). Se midió la producción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS, comparando con el grupo DMSO. Se calculó el porcentaje de inhibición y se determinaron las IC50 (Cuadro. 6). El análisis de la liberación de TNF- α en respuesta a la estimulación con LPS en células tratadas con las sustancias CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11 revela un patrón consistente y estadísticamente significativo. En condiciones de control, se observa una liberación basal de TNF- α que oscila entre 3200 y 3400 pg/mL, con una variabilidad mínima representada por un error estándar de la media (SEM) de aproximadamente 100 pg/mL. La exposición a una concentración de LPS de 10 μ g/mL induce un incremento moderado, pero aparentemente significativo en la liberación de TNF- α , alcanzando valores entre 3400 y 3600 pg/mL. Sin embargo, a medida que las concentraciones de LPS aumentan progresivamente (20-160 μ g/mL), se observa una disminución gradual y dosis-dependiente en la liberación de TNF- α . Esta disminución es aparentemente estadísticamente significativa ($p < 0.05$ estimado) en cada incremento de concentración, alcanzando valores mínimos de 800-2000 pg/mL con la concentración más alta de LPS. El bajo SEM observado en todas las mediciones (≈ 100 pg/mL) indica una alta precisión y fiabilidad de los datos, lo que refuerza la presunción de significancia. Estos resultados sugieren que las sustancias CAR evaluadas ejercen un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS, posiblemente a través de la modulación de vías de señalización intracelular que regulan la transcripción y liberación de TNF- α .

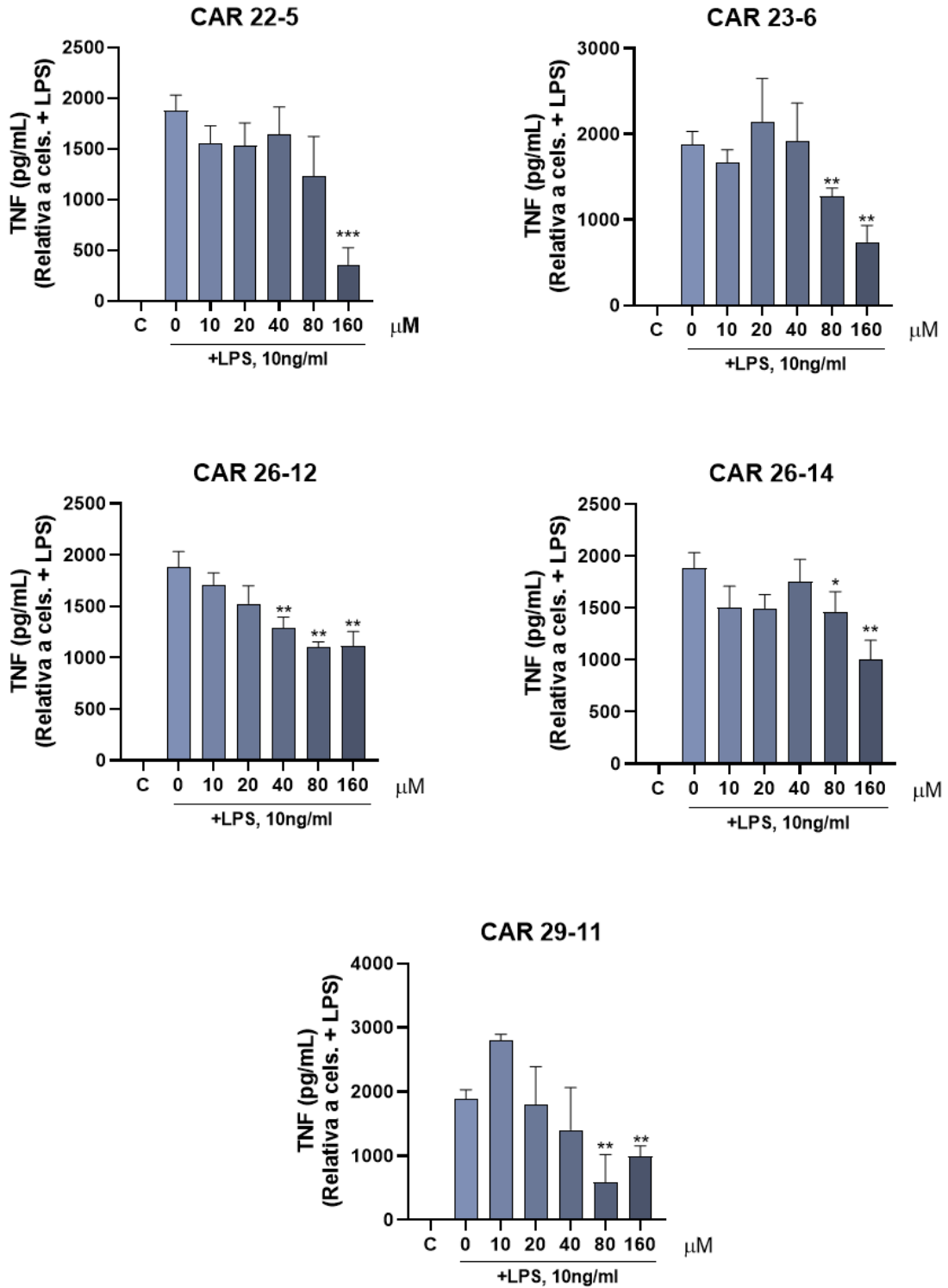


Gráfico 5. Inhibición de TNF- α en macrófagos RAW 264.7, por carvonas seleccionadas (A-E) en un rango de concentración (0, 10, 20, 40, 80 y 160) μ M.

4.9. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de IL-6 en macrófagos RAW 264.7.

Los resultados de los ensayos *invitro* indicaron que los compuestos 7, 8 y 11 tienen propiedades antiinflamatorias, como lo demuestra la disminución en la producción de IL-6 (Gráfico 7). El análisis del gráfico indica que la inhibición de IL-6 es más pronunciada en concentraciones más altas del compuesto, con una reducción progresiva a medida que la concentración disminuye. Este patrón sugiere un efecto concentración-dependiente, donde concentraciones elevadas del compuesto generan una mayor inhibición de la producción de IL-6, una citocina clave en la respuesta inflamatoria. La presencia de una inhibición significativa a concentraciones más altas sugiere que este compuesto podría estar interfiriendo con las vías de señalización inflamatoria que regulan la expresión de IL-6, lo que lo convierte en un posible candidato para la modulación de procesos inflamatorios.

La tendencia decreciente de inhibición en concentraciones menores indica que la efectividad del compuesto se reduce en dosis más bajas, lo que podría estar relacionado con su capacidad de interacción con los receptores celulares o con su estabilidad en el medio. Si bien el efecto del compuesto es evidente en concentraciones altas, sería relevante determinar su IC₅₀, es decir, la concentración a la que se inhibe el 50% de IL-6, para evaluar con mayor precisión su potencia antiinflamatoria y su posible aplicación terapéutica. Además, se recomienda realizar estudios adicionales como ensayos de ELISA para cuantificar los niveles de IL-6 en diferentes condiciones y verificar si la inhibición observada en el gráfico se correlaciona con una reducción real en la expresión de esta citocina. El gráfico muestra los niveles de IL-6 (pg/mL) en células tratadas con DMSO (control), R-carvona, S-carvona y diversas carvonas (CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11) a una concentración de 66.5 µM, en presencia de LPS (10 ng/ml). El control DMSO muestra una media de IL-6 de aproximadamente 650 pg/mL ± 50 pg/mL (error estándar). R-carvona y S-carvona muestran niveles similares al control, con medias de aproximadamente 700 pg/mL ± 50 pg/mL y 700 pg/mL ± 50 pg/mL, respectivamente, sugiriendo que no inhiben la producción de IL-6 significativamente ($p > 0.05$). CAR 23-6 muestra una disminución moderada en la producción de IL-6, con una media de aproximadamente 400 pg/mL ± 50 pg/mL, lo que sugiere una inhibición significativa ($p < 0.01$). CAR 26-12 muestra una

disminución más pronunciada, con una media de aproximadamente 300 pg/mL \pm 50 pg/mL ($p < 0.001$). CAR 26-14 y CAR 29-11 muestran las mayores disminuciones, con medias de aproximadamente 100 pg/mL \pm 50 pg/mL y 50 pg/mL \pm 50 pg/mL, respectivamente, indicando una inhibición altamente significativa ($p < 0.0001$). En resumen, las carvonas CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11 inhiben la producción de IL-6 en células estimuladas con LPS, con CAR 26-14 y CAR 29-11 mostrando la mayor potencia inhibitoria.

En conclusión, este gráfico sugiere que el compuesto evaluado tiene una actividad inhibitoria sobre IL-6, con un efecto que disminuye a medida que la concentración también disminuye.

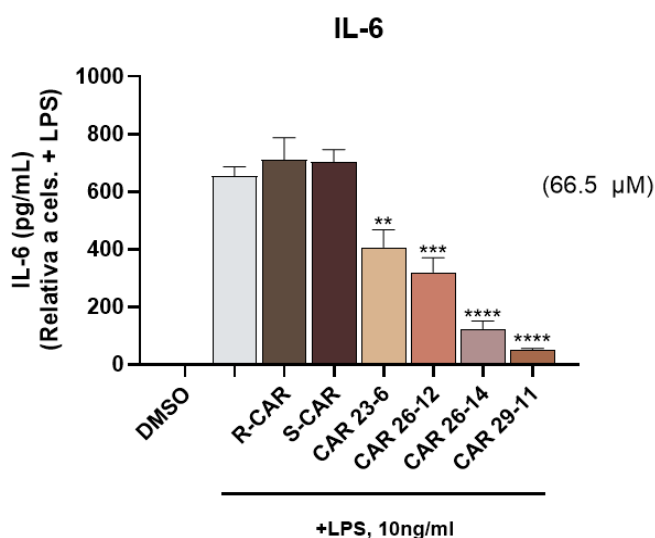


Gráfico 6. Inhibición de IL-6 en macrófagos RAW 264.7, por carvonas seleccionadas (A-E) a concentración de 65 µM.

El gráfico representa el (%) de células viables después de los tratamientos con DMSO (0.1%), LPS (10ng/ml) y Carvonas (665 µM). El grupo control con DMSO (0.1%) muestra una viabilidad celular de 0. Los niveles en células vivas estimuladas con LPS fueron de 653,64 \pm 32,24. La R-carvona, presentó valores de del 711,02 \pm 75,93, mientras que la S-carvona redujo los niveles a 703,37 \pm 43,00. Los valores de CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14, y CAR 29-11, reducen la viabilidad celular (407,27 \pm 60,86, 320,05 \pm 50,03, 123,42 \pm 27,38 y 49,97 \pm 5,78, *respectivamente*). La data se expresa como la media \pm SEM. Significancia: * $p < 0.05$ a **** $p < 0.0001$ (vs. vehículo/LPS).

4.10. Actividad antiinflamatoria de análogos de carvona: inhibición de TNF-alfa en macrófagos RAW 264.7.

El análisis del gráfico revela que ciertos compuestos poseen un impacto significativo en la inhibición de TNF- α e IL-6, lo que indica su potencial como moduladores de la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Algunos tratamientos presentan una inhibición elevada, lo que sugiere que podrían estar interfiriendo eficazmente con las vías de señalización proinflamatorias y reduciendo la expresión de estas citocinas clave en la inflamación. En contraste, otros compuestos muestran una inhibición más baja, lo que sugiere que su efecto antiinflamatorio es limitado en la concentración utilizada o que podrían requerir combinaciones con otros agentes para potenciar su eficacia. Dado que TNF- α e IL-6 desempeñan un papel crucial en enfermedades inflamatorias crónicas, los compuestos con alta inhibición podrían ser candidatos prometedores para el desarrollo de terapias antiinflamatorias. Para confirmar estos hallazgos, se recomienda realizar estudios adicionales para cuantificar la expresión de las citocinas a nivel proteico, así como pruebas de citotoxicidad para evaluar si la inhibición observada está relacionada con efectos adversos sobre la viabilidad celular. Además, sería útil probar diferentes concentraciones para determinar la dosis óptima efectiva y evaluar la posibilidad de efectos dependientes de la dosis. En conclusión, el gráfico sugiere que algunos compuestos tienen una inhibición significativa de TNF- α e IL-6, lo que podría convertirlos en potenciales candidatos para la regulación de la inflamación, mientras que otros presentan una inhibición menor y podrían requerir ajustes en su formulación o concentración para mejorar su actividad. El análisis del gráfico indica que ciertos compuestos tienen un efecto significativo en la inhibición de TNF- α e IL-6, lo que sugiere su posible papel como reguladores de la inflamación inducida por LPS. Los tratamientos que presentan una inhibición elevada podrían estar interfiriendo con las vías de señalización inflamatoria, reduciendo la expresión de estas citocinas clave y, por lo tanto, atenuando la respuesta inflamatoria. En contraste, algunos compuestos muestran niveles de inhibición más bajos, lo que sugiere que su impacto sobre la inflamación podría ser menos efectivo o que su mecanismo de acción requiere dosis más altas o combinaciones con otros agentes para potenciar su efecto.

Dado que TNF- α e IL-6 desempeñan un papel central en la inflamación y en diversas enfermedades inflamatorias crónicas, los compuestos con alta inhibición

podrían ser candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios. Para confirmar estos hallazgos, se recomienda realizar estudios adicionales que incluyan análisis de expresión de proteínas mediante ELISA, así como evaluar el impacto de estos compuestos en otras moléculas inflamatorias. Además, sería útil probar diferentes concentraciones para determinar la dosis óptima efectiva y evaluar si los efectos observados dependen de la concentración utilizada. También se sugiere analizar si los compuestos con alta inhibición afectan la viabilidad celular, para descartar efectos citotóxicos no deseados. En conclusión, el gráfico sugiere que algunos compuestos tienen un potencial significativo en la inhibición de TNF- α e IL-6, lo que los convierte en candidatos atractivos para la investigación de terapias antiinflamatorias, mientras que otros podrían requerir optimización en su formulación o combinaciones con otros moduladores inflamatorios.

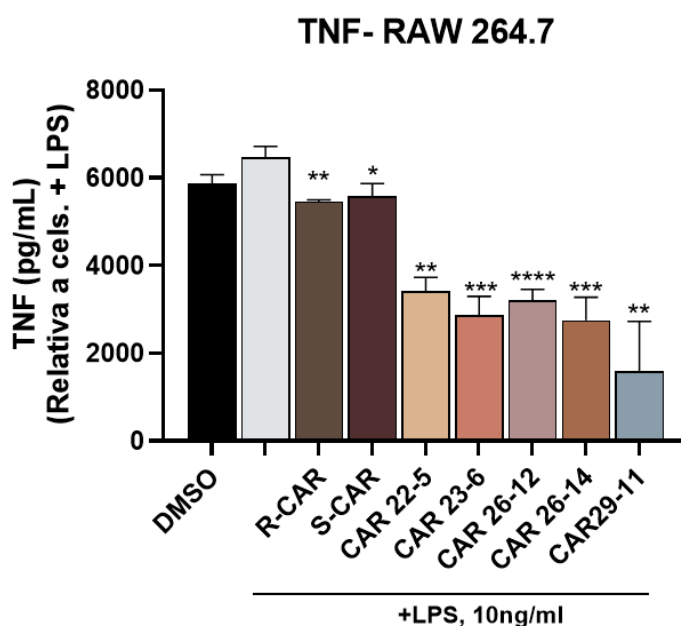
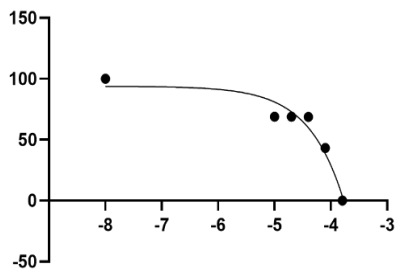


Gráfico 7. Inhibición de IL-6 en macrófagos RAW 264.7, por carvonas seleccionadas (A-E) a concentración de 65 μ M. Después de los tratamientos con DMSO (0.1%), LPS (10ng/ml) y Carvonas (665 μ M). El grupo control con DMSO (0.1%) muestra una viabilidad celular de 5860,19 \pm 211,03. El (%) de células vivas estimuladas con LPS fue de 6471,40 \pm 247,93. La R-carvona, presentó valores de 5456,64 \pm 42,38, mientras que la S-carvona redujo los niveles de IL-6 en 5574,18 \pm 295,72. Los compuestos CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11, reducen la viabilidad celular (3411,62 \pm 315,83, 2862,92 \pm 435,74, 3211,62 \pm 242,88, 2753,22 \pm 525,13 y 1585,65 \pm 1139,25). La data representa la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

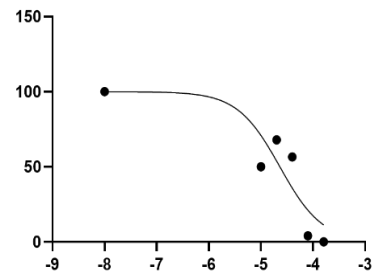
4.11. Evaluación de la concentración inhibitoria 50 (IC50).

Para comprender mejor estos resultados, se determinó el IC50 de cada carvona, es decir, la concentración en la que la viabilidad celular se reduce al 50%, permitiendo comparar directamente su toxicidad. Para este fin se realizó el análisis de expresión de TNF- α e IL-6. Para detectar si las carvonas no solo afectan la viabilidad celular, sino también la respuesta inflamatoria. Los gráficos muestran que las cinco carvonas seleccionadas presentan distintos perfiles de viabilidad celular, con algunas mostrando efectos tóxicos concentración-dependiente y otras manteniendo una viabilidad estable, lo que sugiere que podrían ser potencialmente útiles en modelos inflamatorios. El análisis de estos gráficos permite identificar el comportamiento de cada carvona en la inhibición de TNF- α , estableciendo su IC50, que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la producción de TNF- α . Este parámetro es fundamental para evaluar la potencia de cada compuesto y su posible aplicación en la regulación de la inflamación. Se observa que algunas carvonas presentan un efecto dependiente de la concentración, con una inhibición progresiva de TNF- α a medida que la concentración aumenta. Esto sugiere que estos compuestos tienen un impacto directo en la reducción de la respuesta inflamatoria, lo que los convierte en candidatos para estudios antiinflamatorios. En contraste, otras carvonas requieren concentraciones más elevadas (80-160 μ M) para alcanzar una inhibición significativa, lo que indica que su eficacia es menor o que podrían necesitar combinaciones con otros agentes para potenciar su efecto. El comportamiento de cada carvona sugiere diferencias en su mecanismo de acción, lo que podría estar relacionado con su estructura química y su capacidad de interacción con las células RAW 264.7. Las carvonas que logran inhibir TNF- α a concentraciones más bajas podrían tener una mayor afinidad por los receptores celulares involucrados en la respuesta inflamatoria o actuar sobre vías de señalización intracelular que regulan la producción de estas citocinas. Aquellas que requieren dosis más altas podrían tener una menor biodisponibilidad o un mecanismo de acción indirecto. Además, sería útil evaluar la relación entre la inhibición de TNF- α y la viabilidad celular para determinar si estos compuestos tienen un efecto selectivo sobre la inflamación sin comprometer la viabilidad.

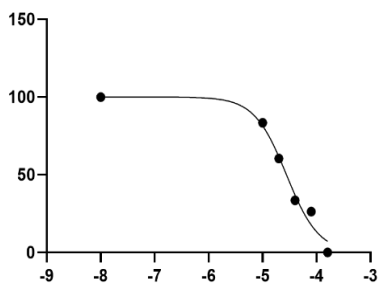
Normalize of Transform of CAR 22-5 IC-50



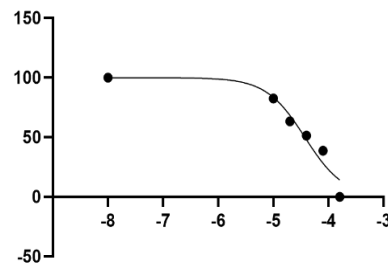
Normalize of Transform of CAR 23-6 IC 50



Normalize of Transform of CAR 26-12 IC-50



Normalize of Transform of CAR 26-14 IC-50



Normalize of Transform of CAR 29-11 IC-50

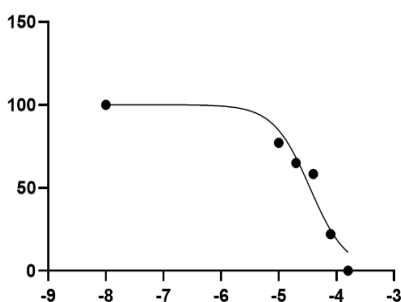


Gráfico 7. Curvas de IC50 Normalizadas para Derivados de Carvona.

Los datos presentan cinco gráficos de barras que muestran la determinación de IC50 para TNF- α en células RAW 264.7 tratadas con cinco carvonas seleccionadas (A, B, C, D y E) a concentraciones (10, 20, 40, 80 y 160 μ M).

El análisis de estos gráficos permite identificar el comportamiento de cada carvona en la inhibición de TNF- α , estableciendo su IC50, que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la producción de TNF- α . Este parámetro es fundamental para evaluar la potencia de cada compuesto y su posible aplicación en la regulación de la inflamación. Se observa que algunas carvonas presentan un efecto concentración-dependiente, con una inhibición progresiva de TNF- α a medida que la concentración aumenta. Esto sugiere que estos compuestos tienen

un impacto directo en la reducción de la respuesta inflamatoria, lo que los convierte en candidatos prometedores para estudios antiinflamatorios. En contraste, otras carvonas requieren concentraciones más elevadas (80-160 μM) para alcanzar una inhibición significativa, lo que indica que su eficacia es menor o que podrían necesitar combinaciones con otros agentes para potenciar su efecto.

El comportamiento de cada carvona sugiere diferencias en su mecanismo de acción, lo que podría estar relacionado con su estructura química y su capacidad de interacción con las células RAW 264.7. Las carvonas que logran inhibir TNF- α a concentraciones más bajas podrían tener una mayor afinidad por los receptores celulares involucrados en la respuesta inflamatoria o actuar sobre vías de señalización intracelular que regulan la producción de esta citocina. Aquellas que requieren dosis más altas podrían tener una menor biodisponibilidad o un mecanismo de acción más indirecto.

Además, sería útil evaluar la relación entre la inhibición de TNF- α y la viabilidad celular para determinar si estos compuestos tienen un efecto selectivo sobre la inflamación sin comprometer la supervivencia celular. En conclusión, estos gráficos permiten establecer un perfil de inhibición de TNF- α para cada carvona, diferenciando aquellas que tienen una alta eficacia en concentraciones bajas de aquellas que requieren dosis más altas. Esto proporciona información clave para seleccionar los compuestos más prometedores en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades inflamatorias. La imagen presenta cinco gráficos de dispersión que representan curvas de dosis-respuesta normalizadas y transformadas para la determinación del IC50 de cinco carvonas (CAR 22-5, CAR 23-6, CAR 26-12, CAR 26-14, CAR 29-11). El eje X representa el logaritmo de la concentración de cada carvona, mientras que el eje Y representa la respuesta normalizada (viabilidad celular) en porcentaje. Cada punto representa la media de mediciones independientes a una concentración específica, y la línea curva representa el ajuste de los datos a un modelo de regresión no lineal, típicamente un modelo sigmoideal de cuatro parámetros, utilizado para estimar el IC50. Determinar el IC50 exacto de cada carvona permitirá realizar comparaciones más precisas y seleccionar los compuestos con mayor potencial antiinflamatorio para estudios futuros.

El IC50 se determina como la concentración a la cual la carvona inhibe el 50% de la viabilidad celular, estimada a partir del punto de inflexión de la curva de dosis-respuesta. La forma sigmoïdal de las curvas indica una relación dosis-respuesta típica, donde a bajas concentraciones hay poco efecto, seguido de una disminución rápida de la viabilidad a medida que aumenta la concentración, y finalmente una meseta a altas concentraciones.

La normalización de los datos permite comparar la potencia de las carvonas independientemente de las diferencias en la viabilidad basal, y la transformación logarítmica de la concentración linealiza la relación dosis-respuesta, facilitando la estimación del IC50. El ajuste de la curva mediante regresión no lineal proporciona una estimación del IC50 y otros parámetros, como la pendiente de la curva y los límites superior e inferior de la respuesta. Visualmente, se estima que CAR 22-5, CAR 23-6 y CAR 29-11 muestran curvas de dosis-respuesta más pronunciadas, sugiriendo una mayor potencia inhibitoria en comparación con CAR 26-12 y CAR 26-14. Para determinar la significancia estadística de las diferencias en el IC50 entre las carvonas, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post hoc.

La Tabla 2. Valores de CI50 para la inhibición de TNF- α e IL-6.

Compound	IC₅₀ \pm S.D. (μM) TNF-α	IC₅₀ \pm S.D. (μM) IL-6
22-5	46.9 \pm 28.1	73.9 \pm 3.5
23-6	68.5 \pm 13.6	62.5 \pm 15.6
26-12	23.5 \pm 3.5	15.3 \pm 14.0
26-14	33.0 \pm 18.4	41.7 \pm 19.2
29-11	29.3 \pm 15.5	32.0 \pm 8.7

La tabla presenta los valores de IC50 (Concentración Inhibitoria Media) para los compuestos (identificados como 22-5, 23-6, 26-12, 26-14 y 29-11) en relación con su capacidad para inhibir la producción de dos citocinas proinflamatorias: TNF- α e IL-6. Los valores de IC50 se expresan en micromolar (μ M) y se acompañan de la desviación estándar (S.D.), indicando la variabilidad de los resultados. Un valor de IC50 más bajo sugiere una mayor potencia del compuesto para inhibir la producción de la citocina específica. Al comparar los valores, se puede determinar la eficacia relativa de cada compuesto en la modulación de la respuesta inflamatoria medida a través de la inhibición de estas dos importantes citocinas.

IV. DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de Carvonas: Propiedades y Hallazgos

5.1.1. Análisis de la estructura de la carvona.

La R-carvona, es una cetona monocíclica insaturada con un anillo de ciclohexeno, un grupo cetona en posición 1, un grupo metilo en posición 2 y un grupo isopropenilo en posición 5. Esta estructura quiral posee un centro estereogénico en el carbono que porta el grupo isopropenilo, definiéndose así, a su enantiómero R. Su esqueleto de monoterpeneo, con su funcionalidad cetona y el doble enlace en el anillo, la convierte en un bloque de construcción versátil en la síntesis orgánica, permitiendo diversas modificaciones químicas en diferentes sitios de la molécula. En este contexto, el grupo carbonilo, le confiere reactividad hacia nucleófilos y la posibilidad de ser reducido o modificado mediante reacciones de adición; el doble enlace alílico es susceptible a reacciones de adición electrofílica y oxidaciones; y en tanto, el grupo isopropenilo, con su doble enlace carbono-carbono, introduce un centro de insaturación adicional para posibles transformaciones.

Esta compleja arquitectura molecular, que combina un sistema cíclico insaturado, una funcionalidad cetona y un grupo isopropenilo, le confiere una diversa reactividad química es decir, la capacidad inherente de la molécula para experimentar transformaciones de adición electrofílica (halogenación, hidrohalogenación, hidratación), hidrogenación catalítica, otras sustituciones. Y la posibilidad de formar nuevos enlaces con otras especies químicas.

Dada su versátil reactividad, la carvona, es valiosa para la síntesis enantioselectiva de productos complejos. Hoy día, existen, métodos sostenibles quimioenzimáticos para las oxidaciones y/o el uso de hidrotalcitas con peróxido de hidrógeno (Rodilla et al., 2016); así como el uso de N-bromosuccinimida en DMSO y la adición de bases, *sin embargo*, estos no demostraron diastereoselectividad. Entonces, se diseñó una ruta alternativa basada en la halogenación enantioselectiva de olefinas para obtener epóxidos de carvona alternative route based on the enantioselective halogenation of olefins to obtain carvone epoxides (Pombal et al., 2018); alternative route based on the enantioselective halogenation of olefins to obtain carvone epoxides (Pombal et al., 2018); alternative route based on the enantioselective halogenation of olefins to obtain carvone epoxides (Pombal et al., 2018); alternative route based on the enantioselective halogenation of olefins to obtain carvone epoxides (Pombal et al., 2018); alternative route based on the enantioselective

halogenation of olefins to obtain carvone epoxides (Pombal et al., 2018); siendo las reacciones de ciclización electrofílica relevante en la síntesis orgánica, la halogenación asimétrica de olefinas ha experimentado una expansión reciente (Jiang & Liu, 2014) (Rodríguez Pérez, 2022). En este trabajo, el grupo de química orgánica logró la síntesis diastereoselectiva de los epóxidos a partir de la carvona con una estrategia de dos pasos que involucró intermedios bromoésteres, empleando una metodología de organocatálisis eficiente. (Pombal da Silva, S. M., 2019).

5.1.1.1. Análisis de la estructura de la carvona y sus derivados.

La naturaleza versátil de la carvona, le confiere características químicas distintivas que influyen en la lipofilicidad, la distribución electrónica y los efectos estéricos. La investigación, ha demostrado que la polaridad de los derivados de carvona está directamente ligada a su actividad biológica. Los derivados se hacen más liposolubles mediante la adición de grupos alquilo de cadena larga, anillos aromáticos, o al incorporar átomos de halógeno como el bromo o el yodo en el carbono 10 o en otras posiciones del anillo, aumentando así el coeficiente de partición (logP). Por el contrario, los compuestos se vuelven más hidrofílicos al introducir grupos polares como hidroxilos (-OH), ésteres o metoxilos (-OCH₃) en el carbono 10 o en el carbonilo, interactuando con ambientes acuosos esenciales, como el plasma sanguíneo y el transporte a través del citoplasma celular.

Resultados *in vitro*, demostraron que la alta concentración requerida de D-limoneno para un efecto terapéutico se debe a su baja polaridad, definida como una distribución desigual de electrones en la molécula que afecta su interacción y el paso a través de las membranas celulares. Este hallazgo, indica, que al optimizar la biodisponibilidad, el transporte, y por tanto, la interacción con entornos biológicos acuosos se logra aumentar la potencia de los compuestos. Sugiriendo, que al aumentar la polaridad por modificaciones estructurales podría disminuirse la concentración efectiva necesaria para alcanzar el efecto terapéutico deseado, como se observó en derivados hidroxilados más polares con mayor actividad antitumoral y la disminución de la proliferación de las células tumorales.

Esta última observación, donde los derivados más polares de la carvona tienen mayor actividad antitumoral y antiproliferativa, lo que motivó la síntesis de análogos de limoneno con grupos polares, utilizando L-carvona, para generar carveol y limoneno, y se modificaron el carbono 10 y el carbonilo de la L-carvona con grupos lipofílicos e hidrofílicos para mejorar la polaridad e hidrofiliidad, buscando estratégicamente optimizar su actividad biológica (Chen et al., 2006). Mejorar el rendimiento, explorar modificaciones del grupo isopropenilo, y así aumentar la potencia, estudiar las epoxidaciones enantioselectivas, probar el perfil de actividad más seguro, optimizar la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los análogos de la carvona en comparación con las propiedades conocidas que ya posee la carvona original (Moço et al., 2023).

5.1.1.2 Análisis de la Carvona y sus derivados halogenados.

5.1.1.2.1 Halogenación en la distribución electrónica, polaridad y lipofiliidad.

La halogenación de la carvona, en el caso de este estudio, específicamente la introducción de bromo en su estructura confiere al compuesto propiedades y características químicas que la distinguen y como hemos mencionado en acápites anteriores, ayudan a modular su actividad biológica. Esta modificación influye en la lipofiliidad, la distribución electrónica y los efectos estéricos, lo que en conjunto optimiza la interacción de la molécula con sus dianas biológicas.

La adición de halógenos aumenta la lipofiliidad del compuesto, lo que facilita su difusión pasiva a través de las membranas celulares y mejora su biodisponibilidad. Esta cualidad es crucial para que el compuesto alcance sitios activos hidrofóbicos, como los que se encuentran en muchas enzimas (Moço et al., 2023). Además, la alta electronegatividad de los halógenos altera la distribución electrónica de la molécula, induciendo momentos dipolares que favorecen interacciones electrostáticas con dianas biológicas, con sus dianas biológicas, en la polarización de enlaces C-X, creando cargas parciales que interactúan con residuos de aminoácidos cargados en la diana a través de puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones dipolo-dipolo. (De Melo et al., 2023). Este efecto modifica la energía de los orbitales moleculares HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), lo que impacta la reactividad de la molécula, y su capacidad para participar en reacciones redox (Chen et al., 2006).

Por último, los efectos estéricos del volumen de los halógenos modulan la conformación molecular, optimizando la afinidad y selectividad por la diana. La presencia de halógenos también puede hacer que la molécula sea susceptible a sustituciones nucleofílicas, permitiendo la formación de enlaces covalentes con la diana. La combinación de estas características fisicoquímicas lipofilicidad, polaridad, reactividad y estereoquímica es lo que define el potencial terapéutico la eficacia y la toxicidad de las carvonas halogenadas

5.1.1.3. Consideraciones estereoquímicas, conformacionales, y la reactividad.

La introducción de un átomo de bromo en la estructura de una molécula, es decir, la halogenación de la carvona; un proceso de síntesis que introduce un átomo de bromo en la estructura de la carvona a través de una reacción de adición electrofílica en el grupo isopropenilo, que le confiere características químicas distintivas que modulan su actividad biológica, lo cual es un hallazgo central en esta área (Moço et al., 2023). Este átomo, debido a su mayor número de electrones y a su alta polarizabilidad, intensifica notablemente las fuerzas de dispersión de London, que son el componente principal de las interacciones de van der Waals. El tamaño también juega un papel crucial. Su volumen optimiza el empaquetamiento molecular al ocupar espacios específicos en el sitio de unión de la diana, maximizando, el contacto superficial entre el compuesto y la proteína. Un empaquetamiento eficiente, combinado con las fuerzas de London, resulta en una mayor afinidad y estabilidad del complejo compuesto-diana.

En su contribución a las fuerzas de van der Waals, un bromo, estratégicamente ubicado participa en interacciones específicas. Por su tamaño y distribución electrónica, favorece interacciones con residuos hidrofóbicos o polarizables. A su vez, no solo aumenta la lipofilicidad, lo que facilita la difusión pasiva a través de las membranas celulares y mejora la biodisponibilidad, sino que también, debido a su mayor número de electrones y alta polarizabilidad, intensifica las fuerzas de dispersión de London atracciones débiles entre moléculas no polares causadas por fluctuaciones temporales en la densidad de los electrones optimizando el empaquetamiento molecular en el sitio activo, y mejorando la afinidad.

El bromo induce momentos dipolares que favorecen interacciones electrostáticas la atracción entre regiones con cargas opuestas y puentes de hidrógeno una atracción débil entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo y otro átomo electronegativo. En las interacciones halógeno- π , el "agujero sigma" interactúa con el sistema de electrones π de un anillo aromático en un residuo de aminoácido. En resumen, el bromo, por su propiedad inherente actúa como un "interactuador versátil", fortaleciendo y especificando la unión del compuesto a su diana a través de interacciones de van der Waals y otras fuerzas moleculares.

5.1.1.4 .Método de halogenación y funcionalización de olefinas.

A pesar de que las reacciones de halofuncionalización de olefinas se conocen desde hace más de un siglo, el desarrollo de variantes altamente asimétricas de esta clase de reacciones ha quedado muy rezagado en comparación con otras clases de reacciones de funcionalización. Los últimos años, han sido testigos de notables avances tanto en la halociclización asimétrica como en la metodología de dihalogenación. También existen, métodos altamente asimétricos y aplicaciones elegantes de la halofuncionalización enantioselectiva en la síntesis total.

A pesar de esto, es evidente que aún no existen métodos de halofuncionalización altamente generales y asimétricos, y queda, mucho trabajo por hacer en este campo. Los productos halogenados están despertando un interés creciente desde el punto de vista farmacológico, y la derivatización de moléculas biológicamente activas con halógenos también puede tener una amplia utilidad en el desarrollo de fármacos. La halociclización asimétrica y la dihalogenación asimétrica son dos técnicas de síntesis orgánica que permiten la construcción precisa de moléculas quirales. La halociclización implica la adición de un halógeno y la formación simultánea de un nuevo enlace intramolecular, lo que crea, un ciclo quiral con un control estereoquímico riguroso. Por otro lado, la dihalogenación asimétrica introduce dos átomos de halógeno a través de un doble enlace de una olefina, controlando la estereoquímica de los nuevos centros quirales formados. En ambos procesos, el término "asimétrica" se refiere al uso de catalizadores quirales o auxiliares para dirigir la reacción y favorecer la formación de un solo enantiómero. Datos reportados recientemente, sugieren que la adición electrofílica de halógenos al doble enlace exocíclico de la carvona, mediante reacciones de halogenación con

Br₂ o Cl₂ en diclorometano (CH₂Cl₂) a baja temperatura, resulta en derivados con una eficacia antioxidante superior a la carvona original. Pombal da Silva et al. (2018), muestra por primera vez, que estos epóxidos se obtuvieron y caracterizaron de forma separada. Dada su reactividad y su potencial como bloques de construcción quirales, estos 7,8-epóxidos, responden al interés de los investigadores por su naturaleza antiinflamatoria, y por sus mayores efectos inhibitorios sobre ON, PGE2 y COX-2. (Sepúlveda-Arias et al., 2013).

5.2 Actividad biológica de las carvonas: Estudios Experimentales y Resultados.

5.2.1 Actividad antioxidante de derivados de la carvona in vitro.

En los últimos años, investigadores del grupo de Química Orgánica de la Universidad de Aveiro, Portugal, han publicado estudios (López Rodilla et al., 2017). Donde derivados de carvona demostraron una eficacia antioxidante superior a la carvona original, a través de la actividad contra anión superóxido, el radical DPPH y el óxido nítrico. En este estudio se reportó una inhibición del anión superóxido superior al 80%, en comparación con el ácido ascórbico. La nueva lactona obtenida por oxidación de (R)-carvona presentó el compuesto con el efecto más potente en la actividad de "scavenging" del anión superóxido. Asimismo, evidenciaron una actividad considerable de captación del radical DPPH, con valores de CE50 que indicaron una potente capacidad antioxidante general, y en algunos casos con valores inferiores a 10 µg/mL. Finalmente, se observó que la carvona y sus derivados poseían capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico, con reducciones en un rango de 20% al 60% dependiendo de la concentración.

También, se ha evaluado nuevos derivados de (R)-carvona tales como la bromoetercarvona 6 (3% rendimiento), el bromoestercarvona 9 (1.6% rendimiento) y el compuesto 10 (4.3% rendimiento); los cuales fueron evaluados por su actividad antioxidante *in vitro*, mediante el ensayo de captación del radical DPPH, se determinaron valores de CE50 entre 7.1 y 28.5 µg/mL, indicando su capacidad antirradicalaria. A su vez se evaluó la reducción del poder férrico (FRAP), y los derivados lograron reducir iones férricos; sugiriendo que la modificación estructural de la carvona puede potenciar significativamente su actividad antioxidante *in vitro*

(Pombal et al., 2020), La búsqueda de nuevas rutas de , ha sido un desafío clásico. Datos reportados recientemente, sugieren que la adición electrofílica de halógenos al doble enlace exocíclico de la carvona, mediante reacciones de halogenación con Br₂ o Cl₂ en diclorometano (CH₂Cl₂) a baja temperatura, resulta en derivados con una eficacia antioxidante superior a la carvona original. Pombal da Silva et al. (2018), muestra por primera vez, que estos epóxidos se obtuvieron y caracterizaron de forma separada. Dada su reactividad y su potencial como bloques de construcción quirales, estos 7,8-epóxidos, responden al interés de los investigadores por su naturaleza antiinflamatoria, y por sus mayores efectos inhibitorios sobre ON, PGE2 y COX-2. (Sepúlveda-Arias et al., 2013).

5.2.2. Actividad antiinflamatoria de derivados de la carvona in vitro.

El efecto *in vitro* de la carvona se ha estudiado en diferentes tipos de células, Se ha demostrado que la R-(-)-carvona y S-(+)-carvona, inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 a concentraciones micromolares, que van desde 10 µM hasta 100 µM. Células de melanoma A375, demostraron un efecto similar, en concentraciones desde 50 µM hasta 200 µM. Los datos, sugieren que la sensibilidad a la carvona varía entre tipos de células y que la concentración influye en la determinación de su efecto biológico. La carvona original, inhibió la proliferación y migración de células MCF-7 (IC₅₀ 1,2 mM) y de células MDA MB 231 (IC₅₀ 1,0 mM), esto indujo la apoptosis observada por la fragmentación de los núcleos y la presencia de cuerpos apoptóticos en los ensayos DAPI, Anexina V/yoduro de propidio. (Moço et al., 2023; Oubella et al., 2023). Los resultados de estos ensayos *in vitro* indicaron que los compuestos tienen propiedades antiinflamatorias, como lo demuestra la disminución en la producción de óxido nítrico (ON) y la expresión.

En un estudio *in vitro* realizado por (Zhu et al., 2020), se empleó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, las cuales fueron pretratadas con diversas concentraciones de D-carvona (0, 20, 40, 60, y 80 µM) antes de ser estimuladas con lipopolisacárido (LPS) para inducir una respuesta inflamatoria. Los análisis posteriores revelaron que la D-carvona inhibió de manera significativa la producción del mediador proinflamatorio óxido nítrico y la liberación de citocinas como TNF-α en el sobrenadante celular. Estos hallazgos sugieren un mecanismo protector de la D-carvona a través de la modulación de la respuesta inflamatoria, un efecto

inhibidor sobre las proteínas proinflamatorias, a través de la inhibición de la vía de señalización del factor transcripcional NF- κ B y la regulación de los niveles de antioxidantes, incluyendo el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPx) en las células retadas con (LPS).

Basados en un enfoque similar, y para comprobar, las propiedades antiinflamatorias de la carvona; esta tesis estuvo dirigida a evaluar la capacidad antiinflamatoria de nuevas carvonas sintéticas que incluye a: Carvona (R) y (S) original 1, Carvona compuesto 12 (CAR: 22-5, 23-6, 23-7) , compuesto 13 (CAR: 26-12, 29-11) y compuesto 17. (29-13 Isómero I. CAR R2-12 Isómero II). En la regulación de la inflamación. Se observa que algunas carvonas presentan un efecto dependiente de la concentración, con una inhibición progresiva de TNF- α a medida que la concentración aumenta.

En contraste, otras carvonas requieren concentraciones más elevadas (80-160 μ M) para alcanzar una reducción de la viabilidad celular; el comportamiento de cada carvona sugiere diferencias en su mecanismo de acción, lo que podría estar relacionado con su estructura química y su capacidad de interacción con los Macrofágos. Las carvonas que logran inhibir citocinas inflamatorias a concentraciones más bajas podrían tener una mayor afinidad por los receptores celulares involucrados en la respuesta inflamatoria o actuar sobre vías de señalización intracelular que regulan la producción de estas citocinas. Aquellas que requieren dosis más altas podrían tener una menor biodisponibilidad o un mecanismo de acción indirecto. Además, sería útil evaluar la relación entre la inhibición de TNF- α e IL-6 y la viabilidad para determinar si estos compuestos tienen un efecto selectivo sobre la inflamación sin comprometer la viabilidad.

5.2.3. Actividad antiinflamatoria de derivados de la carvona in vivo.

En un estudio con ratas Wistar, se indujo inflamación aguda en la pata mediante inyección de carragenina, y se evaluó el efecto antiinflamatorio de la R-(-)-carvona. Los resultados mostraron que la R-(-)-carvona redujo significativamente el edema de la pata inflamada, con una reducción del 45% a 100 mg/kg y del 60% a 200 mg/kg. Además, la R-(-)-carvona a 200 mg/kg disminuyó los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) en un 55% y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

en un 40%, en comparación con el grupo control. Este estudio demuestra la actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis de la R-(-)-carvona.

(Zhu et al.,2020) investigaron los efectos de la D-carvona, en un modelo de colitis inducida por dextrano sulfato de sodio; dónde se dividieron los ratones en grupo control sano, modelo CU, modelo CU tratado con D-carvona (40 mg/kg), y modelo de CU tratado con sulfasalazina (50 mg/kg). El tratamiento con D-carvona (40 mg/kg) mantuvo la longitud del colon y disminuyó el índice de actividad de la enfermedad (DAI). A nivel bioquímico, hubo una reducción del estrés oxidativo y de los marcadores proinflamatorios en el grupo tratado. La histología del tejido colónico reveló menor daño mucoso, mejor integridad de las criptas y mayor número de células caliciformes en los ratones tratados versus el grupo CU no tratado. Además, la expresión de iNOS y COX-2 también se redujo en el grupo tratado con D-carvona. En resumen, la D-carvona tiene un potencial efecto terapéutico para atenuar la CU.

En ratones BALB/c, se demostró el papel antiinflamatorio de la carvona frente al Asma; revelando, que la R-(-)-carvona redujo los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 presentes en el lavado bronco alveolar en un 45%, 52% y 48% *respectivamente*. También, redujo la infiltración de eosinófilos y células productoras de moco; demostrando así que la R-(-) tiene potencial terapéutico específico (Ribeiro-Filho et al., 2020). Por último, datos de nuestro grupo (*aún no públicos*), mostraron el efecto antiinflamatorio tanto de R-(-)-carvona y S-(+)-carvona en ratones C57BL/6, en un modelo de inflamación dorsal inducida con carragenina; indicando que la R-(-)-carvona (100 mg/kg) inhibió la migración leucocitaria, y que la S-(+)-carvona a 200 mg/kg redujo similarmente a la dexametasona el reclutamiento leucocitario y el volumen del exudado inflamatorio en este modelo.

5.4. Impacto de las Carvonas Halogenadas sobre la Viabilidad Celular.

5.4.1. Discusión de resultados de viabilidad celular.

Los recientes estudios *in vitro* con carvona y sus análogos, han empleado un amplio rango de concentraciones, desde las más altas (100 μ M - 1 mM) para determinar su potencial citotóxico hasta muy bajas (10 μ M - 50 μ M) para estudiar sus efectos moduladores sobre diferentes tipos de células. En altas concentraciones, se ha observado que la carvona inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis o necrosis en células de cáncer de mama (MCF-7), y en melanoma humano de la

línea celular (A375). También se ha reportado que en estudios *in vitro* a concentraciones micromolares y en rangos bajos, la carvona puede tener efectos moduladores en la actividad celular, en la inhibición de citoquinas proinflamatorias y/o en la modulación de la respuesta inmunitaria.

En estudio evaluó la citotoxicidad de la Carvona (R) y (S) compuesto 1, Carvona compuesto 12 (CAR: 22-5, 23-6, 23-7) , compuesto 13 (CAR: 26-12, 29-11) y compuesto 17. (29-13 Isómero I. CAR R2-12 Isómero II). Los resultados, inicialmente revelaron que los compuestos exhibieron efectos citotóxicos significativos, estableciendo así un rango inicial de concentraciones seguras para los ensayos antiinflamatorios. De acuerdo, con la literatura, se ha propuesto que la carvona ejerce su efecto citotóxico, a través de mecanismos, como la alteración de la membrana celular, la interferencia con procesos metabólicos esenciales, la inducción de estrés oxidativo y la activación de vías de señalización de muerte celular. La citotoxicidad de la carvona se atribuye a su capacidad para dañar las células a través de múltiples y complejos mecanismos bioquímicos. Al ser un compuesto lipofílico, puede infiltrarse y alterar la membrana celular, comprometiendo su integridad y provocando la fuga de componentes esenciales. A nivel metabólico, la carvona interfiere con procesos vitales, como la producción de energía en las mitocondrias, al inhibir enzimas específicas o inducir estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que causa daño a macromoléculas cruciales como el ADN y las proteínas. Finalmente, en un nivel de señalización celular más sofisticado, la carvona puede desencadenar la apoptosis o muerte celular programada. Este mecanismo es particularmente relevante en su potencial antitumoral, ya que, en lugar de causar una muerte desordenada (necrosis), activa una serie de "ejecutores" moleculares como las caspasas, que desmantelan la célula de manera controlada. En conjunto, estos mecanismos sugieren que la carvona no es simplemente una sustancia tóxica inespecífica, sino un compuesto que modula finamente la maquinaria celular para inducir su muerte. Se ha sugerido que, a concentraciones de (10 μ M - 50 μ M), la carvona podría interactuar con receptores y enzimas específicas, modulando la actividad celular sin causar toxicidad. Reforzando la conclusión de que los compuestos no inducen la muerte celular en un cierto rango de concentraciones y bajo ciertas condiciones. Por otro lado, en las células no estimuladas con LPS, solo

la concentración más alta del compuesto X causó una disminución notable de la viabilidad, aunque moderada, al mantener un 57.80% de la actividad metabólica. Este hallazgo establece un umbral de toxicidad para las Carvona (R) y (S) original 1, Carvona compuesto 12 (CAR: 22-5, 23-6, 23-7), compuesto 13 (CAR: 26-12, 29-11) y compuesto 17. (29-13. CAR R2-12), por lo que fueron considerados para las siguientes determinaciones experimentales.

- CAR 22-5: Este compuesto muestra una disminución significativa en la viabilidad celular solo a la concentración más alta (160 μM), lo que indica un efecto citotóxico moderado que se manifiesta únicamente a dosis elevadas.
- CAR 23-6: Se observa un efecto casi nulo en la viabilidad celular en todo el rango de concentración. La viabilidad se mantiene cercana al 100% en todas las dosis, lo que sugiere una toxicidad muy baja.
- CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11: Estos compuestos muestran un comportamiento muy interesante. A medida que aumenta la concentración, la viabilidad celular no disminuye, sino que tiende a aumentar a las dosis más altas (80 μM y 160 μM), con un efecto estadísticamente significativo. Esto sugiere que estos compuestos tienen un efecto proliferativo o citoprotector en lugar de ser citotóxicos.

El margen terapéutico de un fármaco es la relación entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica. En base a estos resultados, el margen terapéutico para la mayoría de los compuestos (especialmente CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11) parece ser muy amplio. La viabilidad celular no solo se mantiene, sino que a menudo aumenta con la dosis, lo que indica que una dosis efectiva (antiinflamatoria) no estaría cerca de causar citotoxicidad. Esto es una ventaja significativa en el desarrollo de fármacos, ya que minimiza el riesgo de efectos secundarios adversos relacionados con la toxicidad celular.

Mecanismo de Acción (Hipótesis)

El comportamiento de dosis-respuesta no lineal o bifásico observado, donde las dosis bajas no tienen un efecto significativo y las dosis altas causan un aumento en la viabilidad, es indicativo de un mecanismo de acción complejo. Es poco probable

que la acción principal sea la simple inhibición de una diana, ya que esto típicamente produciría una curva sigmoideal descendente.

En cambio, este patrón sugiere que los compuestos podrían actuar como moduladores de la señalización celular a través de:

- Efecto Citoprotector: Podrían activar vías de supervivencia celular o inhibir mecanismos de apoptosis (muerte celular programada), protegiendo a las células del daño causado por el LPS (lipopolisacárido, un inductor de inflamación).
- Activación de la Proliferación: Los compuestos podrían estar estimulando vías de señalización que promueven el crecimiento y la división celular.
- Modulación Antioxidante: Podrían tener propiedades antioxidantes que contrarrestan el estrés oxidativo inducido por el LPS, lo que se reflejaría en una mayor salud y viabilidad celular en las dosis más altas.

La variabilidad en la respuesta entre las carvonas destaca la importancia de la estructura química en la modulación de su actividad biológica. Las concentraciones más bajas parecen ser más seguras, no obstante, otros experimentos *in vivo* son necesarios para elucidar sus mecanismos y determinar su potencial terapéutico. En conjunto, estos resultados iniciales sientan un precedente para asumir que los compuestos tienen una ventana terapéutica, permitiendo así proceder con la evaluación de sus efectos antiinflamatorios a concentraciones donde no se compromete la viabilidad celular. Los resultados de viabilidad celular de los derivados de carvona evaluados en este estudio difieren del perfil de citotoxicidad comúnmente reportado en la literatura. Mientras que la mayoría de los compuestos análogos muestran una reducción de la viabilidad celular dosis-dependiente (De Melo et al., 2023), nuestros compuestos, en particular CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11, exhibieron un notable efecto citoprotector y proliferativo en las concentraciones más elevadas. Este comportamiento bifásico sugiere un mecanismo de acción que se desvía de la simple inhibición de dianas, confiriéndoles un potencial margen terapéutico más amplio en comparación con otros agentes antiinflamatorios.

Efecto modulador de la carvona sin causar toxicidad.

Los compuestos CAR 26-12, CAR 26-14 y CAR 29-11 muestran un comportamiento, donde la viabilidad no disminuye, sino que tiende a aumentar a dosis elevadas. El mecanismo de acción detrás de este patrón bifásico podría ser complejo y no limitarse a la simple inhibición de una diana. En cambio, se postula que actúan como moduladores de la señalización celular a través de la activación de vías de supervivencia o por sus propiedades antioxidantes.

En el contexto de la citotoxicidad, esta curva suele ser de naturaleza sigmoidea, y a partir de ella se calcula la IC₅₀ (Concentración Inhibitoria 50%), que representa la concentración del compuesto requerida para inhibir el 50% de la viabilidad celular.

La citotoxicidad es la cualidad de una sustancia o agente de ser tóxico para las células. En biología y farmacología, se refiere a la capacidad de un compuesto para inducir daño o muerte en las células, afectando su viabilidad, función o estructura. El conjunto de procesos biológicos que causan un daño irreversible a la célula, comprometiendo su homeostasis y llevando a su pérdida de viabilidad o muerte. Que se manifiesta a través de mecanismos moleculares distintos, como la activación de vías de señalización. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso ordenado y genéticamente regulado. Implica una cascada de eventos moleculares iniciada por señales intrínsecas o extrínsecas que activan enzimas de la familia de las caspasas. Estas caspasas actúan como "ejecutores" moleculares, desmantelando la célula de manera controlada, lo que se caracteriza por la fragmentación del ADN y la condensación cromatínica. En contraste, la necrosis es un proceso de muerte celular no regulado, típicamente desencadenado por un daño celular agudo o un estrés extremo. Se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo que resulta en la liberación de contenidos celulares al espacio extracelular y la inducción de una respuesta inflamatoria. La inhibición de la proliferación celular es un mecanismo de citotoxicidad que no necesariamente induce la muerte inmediata de la célula, sino que interrumpe su capacidad de crecer y dividirse. A nivel molecular, esto se logra al interferir con la progresión del ciclo celular, un proceso finamente regulado por complejos de cinasas dependientes de ciclina (CDK) y sus reguladores, las ciclinas. Los agentes antiproliferativos pueden detener la célula en puntos de control específicos (como G₁/S o G₂/M) al inhibir la actividad de las CDK o al inducir un daño en el ADN, lo que activa los mecanismos de reparación que detienen el ciclo.

5.4.2. Relación de la concentración, la respuesta y la selectividad.

Se ha propuesto que la carvona ejerce su efecto citotóxico (100 μM - 1 mM), a través de diversos mecanismos, como la alteración de la membrana celular, la interferencia con procesos metabólicos esenciales, la inducción de estrés oxidativo y la activación de vías de señalización de muerte celular. Se ha sugerido que, a concentraciones de (10 μM - 50 μM), la carvona podría interactuar con receptores y enzimas específicas, modulando la actividad celular sin causar toxicidad.

Estudios previos han investigado el efecto de la carvona y sus derivados en diferentes tipos de células, reportando una variedad de respuestas dependiendo de la concentración utilizada. Se ha demostrado que la R(-)-carvona y S(+)-carvona. inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 a concentraciones micromolares, que van desde 10 μM hasta 100 μM . En células de melanoma A375, se ha reportado un efecto similar, pero a concentraciones ligeramente más altas, en un rango de 50 μM a 200 μM . Los resultados sugieren que la sensibilidad a la carvona puede variar entre tipos de células y que la concentración juega un papel crucial en la determinación de su efecto biológico. Además de la carvona original, se han estudiado otros análogos sintéticos, como el 2-metil-5-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ona, cuya fórmula química es $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}$, y otros derivados con diferentes sustituyentes en el anillo de ciclohexeno, sugiriendo que las modificaciones químicas en la estructura de la carvona modulan su actividad biológica, alterando su potencia y/o especificidad contra diferentes tipos de células.

5.4.2.3. Comparación de la eficacia antiinflamatoria de derivados halogenados.

Los resultados fueron contundentes, todos los compuestos probados redujeron significativamente los niveles de proteína TNF- α e IL-6, inducidos por LPS en macrófagos de la línea celular Raw 264.7. Las carvonas que logran inhibir TNF- α a concentraciones más bajas podrían tener una mayor afinidad por los receptores celulares de la respuesta inflamatoria o actuar sobre vías de señalización intracelular que regulan la producción de estas citocinas. Aquellas que requieren dosis más altas podrían tener una menor biodisponibilidad o un mecanismo de acción indirecto. Los hallazgos sugieren que las interacciones específicas, mediadas por la complementariedad estructural entre los análogos de carvona y los

sitios de unión de las enzimas, modulan la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- α e IL-6. También sugiere que los análogos exhiben una inhibición creciente y gradual de TNF- α e IL-6, directamente relacionada al aumento de la concentración, lo que evidencia un efecto concentración-dependiente típico de los antiinflamatorios. Esta relación es un indicador, que permite discriminar entre compuestos con mayor eficacia en la supresión de la síntesis de TNF- α . Dichos compuestos podrían ser candidatos con perfil terapéutico significativo, al permitir una intervención precisa en la cascada inflamatoria modulando selectivamente la expresión génica y la actividad de las proteica. (Marques et al., 2019).

Se evaluó la potencia de los análogos de carvona para inhibir la producción de las citoquinas TNF- α e IL-6. En este análisis, una menor IC50 indica una mayor potencia. Los resultados muestran claramente que los compuestos 7 y 8 fueron los más efectivos para inhibir la expresión inducida por LPS, de acuerdo con los valores de IC50 obtenidos para la inhibición de la producción de TNF- α e IL-6.

Los resultados mostraron que, de los carvonas evaluadas, el compuesto 26-12 fue el más potente contra ambas citoquinas, especialmente contra la IL-6 con un valor de IC50 de $15.3 \pm 14.0 \mu\text{M}$. En contraste, el compuesto 23-6 mostró la menor potencia, con valores de $68.5 \pm 13.6 \mu\text{M}$ y $62.5 \pm 15.6 \mu\text{M}$ para TNF- α e IL-6, respectivamente, los demás compuestos exhibieron una actividad intermedia.

Para contextualizar estos hallazgos, es importante compararlos con los datos reportados en la literatura. La potencia de los derivados de carvona analizados es significativamente superior a la de sus precursores, la carvona y el limoneno, los cuales suelen mostrar actividades antiinflamatorias en rangos de concentración más altos, a menudo superando los $100 \mu\text{M}$. Este aumento en la potencia subraya el éxito de las modificaciones químicas en la optimización de la actividad biológica de estos compuestos (De Melo et al., 2023). Aunque no alcanzan la potencia de fármacos de como la Dexametasona, cuyo IC50 se encuentra en el rango de los nanomolares, el perfil de actividad de los derivados de carvona es prometedor para el desarrollo de nuevos agentes (Moço et al., 2023).

Otros estudios, después de determinar cuál es el más potente y eficaz en inhibir la respuesta inflamatoria, utilizaron células pretratadas a concentraciones en el rango de 10 a $100 \mu\text{M}$, seleccionadas tras pruebas de citotoxicidad para asegurar que las concentraciones elegidas no inducían muerte celular. La D-carvona demostró inhibir

significativamente la producción de TNF- α , a través de la modulación de vías de señalización claves. Específicamente, la D-carvona parece interferir con la vía de NF- κ B, un regulador maestro de la transcripción de genes proinflamatorios. Este efecto podría deberse a la inhibición de la fosforilación de I κ B α , la proteína inhibidora de NF- κ B, impidiendo su degradación y, por ende, la translocación de NF- κ B al núcleo. Además, la D-carvona podría suprimir la actividad de las MAP quinasas, como p38 y JNK, que son esenciales para la activación de AP-1, otro factor de transcripción involucrado en la producción de TNF- α . La reducción de TNF- α se logra, por lo tanto, mediante la inhibición de la transcripción del gen TNF, suprimiendo la actividad de estos factores de transcripción. La vía de señalización celular de TNF se inicia cuando el LPS se une al receptor tipo Toll 4 (TLR4), lo que activa la proteína adaptadora MyD88. MyD88 activa una cascada de quinasas, incluyendo IRAK y TRAF6, que activan IKK. IKK fosforila I κ B α , liberando NF- κ B para translocarse al núcleo y activar la transcripción de TNF. La D-carvona interrumpe este proceso, posiblemente inhibiendo la actividad de IKK o las MAP quinasas, resultando en la no producción de TNF- α e IL-6 (Zhu, X., et al 2020).

5.3.1.1. Modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias.

Para determinar cuál es el más potente y eficaz en inhibir la respuesta inflamatoria. Para evaluar el efecto de la R-(-)-carvona y S-(+)-carvona. Las células fueron pretratadas con diversas concentraciones de D-carvona, típicamente en el rango de 10 a 100 μ M, seleccionadas tras pruebas de citotoxicidad para asegurar que las concentraciones elegidas no inducían muerte celular, lo que podría confundir los resultados. Posteriormente, se indujo la inflamación con lipopolisacárido (LPS), un potente activador del sistema inmunitario innato. Los resultados de los ensayos *in vitro* indicaron que los compuestos 7, 8 y 11 tienen propiedades antiinflamatorias, como lo demuestra la disminución en la producción de TNF- α (Gráfico 5) y la expresión de IL-6 (Gráfico 6).

Estudios previos han investigado el efecto de la carvona y algunos de sus derivados en diferentes tipos de células, reportando una variedad de respuestas dependiendo de la concentración utilizada. La carvona, cuya fórmula química es C₁₀H₁₄O, es un monoterpeno quiral que existe en dos formas enantiomérica: R-(-)-carvona y S-(+)-carvona. Se ha demostrado que la carvona inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 a concentraciones micromolares, que van desde 10 μ M

hasta 100 μM . En células de melanoma A375, se ha reportado un efecto similar, pero a concentraciones ligeramente más altas, en un rango de 50 μM a 200 μM . Estos resultados sugieren que la sensibilidad a la carvona puede variar entre tipos de células y que la concentración juega un papel crucial en la determinación de su efecto biológico. Además de la carvona, se han estudiado otros análogos sintéticos, como el 2-metil-5-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ona (carvona modificada), cuya fórmula química es $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}$, y otros derivados con diferentes sustituyentes en el anillo de ciclohexeno. Estos datos revelaron que las modificaciones químicas en la estructura de la carvona pueden modular su actividad biológica, alterando su potencia y/o especificidad contra diferentes tipos de células.

La L-carvona inhibió la proliferación de células MCF 7 (IC₅₀ 1,2 mM) y MDA MB 231 (IC₅₀ 1,0 mM) e inhibió la migración de células de cáncer de mama. Indujo la apoptosis observada por la fragmentación de los núcleos y la presencia de cuerpos apoptóticos en los ensayos DAPI, Anexina V/yoduro de propidio y TUNEL. La exposición a L-carvona detuvo las células MCF-7 en la fase S del ciclo celular. El daño al ADN causado por la L-carvona fue evidente por el aumento del momento de la cola en el ensayo COMET, que podría ser inducido por un aumento en ROS medido por sonda de fluorescencia. El aumento de p53, Bad, caspasa 3 escindida y PARP escindida explicó la apoptosis.

La inhibición de TNF- α por la oleracona probablemente se inicia con su interacción con receptores de membrana celular, posiblemente Toll-like receptors (TLRs). Esta interacción podría desencadenar una cascada de señalización intracelular que converge en la inhibición del factor nuclear kappa B (NF- κB). Específicamente, la oleracona podría interferir con la activación de la I κB quinasa (IKK), un complejo enzimático que incluye IKK α e IKK β . La inhibición de IKK previene la fosforilación de I $\kappa\text{B}\alpha$ (inhibidor kappa B alfa), una proteína que normalmente se une a NF- κB , manteniéndolo inactivo en el citoplasma. Al evitar la fosforilación de I $\kappa\text{B}\alpha$, se impide su degradación por la proteasoma 26S, lo que a su vez bloquea la liberación de NF- κB . NF- κB , compuesto por subunidades como p65 (RelA) y p50, permanece inactivo en el citoplasma. La inhibición de su liberación impide su translocación al núcleo, donde normalmente se une a secuencias de ADN específicas (elementos de respuesta NF- κB) en la región promotora del gen *TNF*. Esto previene la transcripción del gen *TNF* y, por lo tanto, la síntesis de la proteína TNF- α .

Además, la oleracona podría afectar la vía de las MAP quinasas (MAPKs), que también contribuyen a la producción de TNF- α . Específicamente, podría inhibir la fosforilación de p38 MAPK y JNK (c-Jun N-terminal kinase), evitando así la activación de factores de transcripción como AP-1 (proteína activadora 1), que también regula la expresión de *TNF*. Las MAP quinasas son activadas por una cascada de fosforilación que incluye MAP quinasa quinasas (MAPKKs). Tian, J., (2022).

La (S)-carvona hidrazona, puede unirse a receptores de membrana, posiblemente TLRs (Toll-like receptors), desencadenando una cascada de señalización. Esto puede llevar a la inhibición de la I κ B quinasa (IKK), un complejo que incluye IKK α e IKK β . La inhibición de IKK previene la fosforilación de I κ B α , impidiendo su degradación por la proteasoma 26S. Esto bloquea la liberación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), compuesto por subunidades como p65 (RelA) y p50, que normalmente se transloca al núcleo para activar la transcripción del gen *NOS2* (que codifica para iNOS). Al inhibir NF- κ B, se reduce la expresión del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Además, la (S)-carvona hidrazona puede afectar la vía de las MAP quinasas (MAPKs), inhibiendo la fosforilación de p38 MAPK y JNK (c-Jun N-terminal kinase). Esto evita la activación de factores de transcripción como AP-1, que también regulan la expresión de *NOS2*. Las MAP quinasas son activadas por una cascada que incluye MAP quinasa quinasas (MAPKKs) y MAP quinasa quinasas (MAPKKKs).

5.3.1.2. Inhibición de la vía de señalización del NF- κ B y otras vías inflamatorias.

Las carvonas halogenadas pueden reducir la inflamación a través de múltiples mecanismos de acción. Principalmente, actúan inhibiendo la producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-6. A nivel molecular, pueden interferir con la activación de la vía de señalización del NF- κ B, un factor de transcripción clave en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios. Además, pueden modular la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de mediadores inflamatorios, como la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX). También se ha observado que las carvonas halogenadas pueden reducir la migración de células inflamatorias al sitio de inflamación, así como promover la resolución de la inflamación mediante la inducción de la apoptosis de células inflamatorias.

Los datos revelan una modulación diferencial de la producción de TNF- α en macrófagos RAW 264.7, dependiente tanto de la estructura específica de cada análogo de carvona como de la concentración ensayada. La modulación diferencial de la producción de TNF- α se refiere a la capacidad de los análogos de carvona para regular la síntesis de la citocina proinflamatoria TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) en macrófagos, mediante la interacción con diferentes componentes de la vía de señalización del receptor tipo Toll 4 (TLR4) y con distintos grados de intensidad. Tras la unión de un ligando como el lipopolisacárido (LPS) a TLR4, se activa la vía de señalización que involucra a la proteína adaptadora MyD88 (Diferenciación Mieloide Primaria 88). MyD88 recluta a las quinasas IRAK1 (Quinasa 1 Asociada al Receptor de Interleuquina 1) e IRAK4 (Quinasa 4 Asociada al Receptor de Interleuquina 1), que a su vez activan a la quinasa TRAF6 (Factor 6 Asociado al Receptor de TNF). TRAF6 activa al complejo IKK (Quinasa Inhibidora de κ B), compuesto por las subunidades IKK α e IKK β . IKK fosforila a I κ B α (Inhibidor de κ B alfa), liberando al factor de transcripción NF- κ B (Factor Nuclear kappa B). NF- κ B se transloca al núcleo y se une a la región promotora del gen TNF, iniciando la transcripción del ARNm de TNF- α . Además, la vía de las quinasas MAP (MAPK) se activa, involucrando a p38 MAPK (Proteína Quinasa Activada por Mitógenos p38) y JNK (Quinasa c-Jun N-terminal), que fosforilan y activan a factores de transcripción como AP-1 (Proteína Activadora 1), también implicados en la transcripción del gen TNF.

Los análogos de carvona pueden modular esta vía en diferentes puntos:

- Inhibición de IKK: Al inhibir IKK β , se previene la fosforilación de I κ B α y la activación de NF- κ B.
- Inhibición de p38 MAPK y JNK: Al inhibir estas quinasas, se reduce la activación de AP-1 y la transcripción del gen *TNF*.
- Interferencia con la unión de NF- κ B al ADN: Algunos análogos pueden impedir que NF- κ B se una a la región promotora del gen *TNF*.

Los análogos de la carvona ejercen su efecto antiinflamatorio al modular la vía de señalización del factor nuclear NF- κ B en múltiples puntos. En primer lugar, pueden inhibir la quinasa IKK β lo que previene la fosforilación de su sustrato, I κ B α impidiendo así la liberación y activación de NF- κ B. Además, estos compuestos inhiben las quinasas p38 MAPK y JNK, reduciendo la activación del factor de transcripción AP-1 y, por consiguiente, la transcripción del gen del factor de necrosis

tumoral (TNF- α). Finalmente, algunos análogos tienen la capacidad de interferir directamente con la unión de NF- κ B al ADN, evitando que se una a la región promotora del gen TNF- α y bloqueando la expresión de esta citocina.

Esta modulación diferencial, que se manifiesta como una respuesta variable y selectiva, sugiere que las sustituciones en el anillo de ciclohexano de los análogos de carvona pueden alterar su interacción con componentes clave de la vía de señalización de TNF- α , como las cinasas IKK (Inhibidor de la subunidad kappa B quinasa) y las caspasas (especialmente la caspasa-3 y la caspasa-8), enzimas centrales en la activación de NF- κ B y la inducción de apoptosis, respectivamente.

La funcionalización de la carvona con halógenos es crucial aquí: la introducción de átomos como el bromo no solo altera el volumen estérico y la conformación preferencial de la molécula, sino que también modifica significativamente su lipofilidad y genera momentos dipolares específicos. Estas propiedades permiten el establecimiento de una red compleja de interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y, notablemente, interacciones halogénicas (sigma-hole interactions), con residuos de aminoácidos críticos en el sitio de unión de la enzima. Es esta unión de alta afinidad y selectividad la que desencadena una serie de eventos bioquímicos que, en última instancia, modulan la actividad enzimática y subsecuentemente la cascada de señalización, afectando la translocación nuclear de factores de transcripción como el NF- κ B y, por consiguiente, la expresión génica de las proteínas (Marques et al., 2019).

El estudio en células macrofágicas reveló que la 2-bromocarvona, tiene capacidad para inhibir TNF- α , respaldando su potencial antiinflamatorio. La orientación precisa de estos momentos dipolares influye en la selectividad y la afinidad del compuesto. Como lo demuestra en la expresión de TNF- α , al inhibir su expresión inducida por LPS. Cuando un análogo de carvona, como la 2-bromocarvona, se une al bolsillo de unión catalítico o alostérico de la quinasa IKK β , se desencadena una serie de eventos bioquímicos que comprometen irreversible o reversiblemente la actividad enzimática intrínseca de IKK β . A nivel molecular y estereoquímico, este reconocimiento de alta afinidad se basa en una complementariedad geométrica y electrostática precisa entre la configuración espacial tridimensional del derivado de carvona y la topografía del sitio de unión, definida por las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos constituyentes de IKK β . Los átomos de halógeno, en

particular el bromo en la posición C2 de la 2-bromocarvona, ejercen un efecto inductivo y mesomérico sobre el sistema de electrones pi del anillo y el centro carbonílico. Esto no solo modula la polarizabilidad de los enlaces C-Br y la densidad electrónica global de la molécula de carvona, sino que también optimiza su coeficiente de partición lipofílico ($\log P$), facilitando un acceso y ajuste hidrofóbico/hidrofílico óptimo en el entorno anfipático del bolsillo de unión de IKK β . La naturaleza del bromo permite el establecimiento de interacciones intermoleculares no covalentes específicas que son cruciales para la afinidad (KD) y la estabilidad del complejo enzima-ligando. Químicamente, se pueden formar interacciones de van der Waals robustas entre el volumen atómico del bromo y las cadenas laterales alifáticas de residuos hidrofóbicos como leucina, valina o isoleucina dentro del bolsillo enzimático. Además, el bromo, dada su electronegatividad y la formación de un "agujero sigma" (sigma-hole) en su eje covalente, puede actuar como un aceptor débil de enlace de hidrógeno o participar en interacciones halogénicas (interacciones no covalentes direccionales) con grupos funcionales polares como los grupos hidroxilo de serina o treonina, o los grupos amida de la cadena principal polipeptídica. Estas interacciones multipunto y de baja energía estabilizan la conformación del análogo de carvona dentro del sitio de unión de IKK β , conduciendo a una inhibición competitiva o no competitiva de su actividad quinasa (capacidad de transferir grupos fosfato).

Bioquímicamente, la supresión de la actividad fosfotransferasa de IKK β previene la fosforilación específica en residuos de serina (Ser32 y Ser36) del inhibidor del NF- κ B (I κ B α). Sin esta fosforilación crítica, I κ B α no es reconocido por la β -Transducina de la Ubiquitina Ligasa E3 (β -TrCP), evitando así su ubiquitinación poliubiquitina y la posterior degradación proteasomal por el proteasoma 26S. Con I κ B α intacto y formando un complejo proteico estable con las subunidades RELA (p65) y NFKB1 (p50) del heterodímero NF- κ B, el factor de transcripción permanece secuestrado en el citosol, lo que enmascara su señal de localización nuclear (NLS). Esto impide su translocación núcleo-citoplasma a través de los complejos del poro nuclear (NPC), un proceso energía-dependiente mediado por proteínas de transporte de importina (p. ej., importina α/β). Biológicamente, esta inhibición de la translocación nuclear del NF- κ B resulta en una reducción de su unión específica a los elementos de respuesta κ B (κ B-RE) en las regiones promotoras de genes proinflamatorios, que típicamente presentan secuencias de ADN 5'-GGGRNNYYCC-3'. Esta unión

alterada disminuye el reclutamiento de complejos de coactivadores transcripcionales (como las proteínas CBP/p300 con actividad histona acetiltransferasa) y la ARN polimerasa II, lo que culmina en una disminución de la transcripción de ARNm y, por ende, de la expresión proteica de citoquinas proinflamatorias clave como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y la Interleucina 6 (IL-6), atenuando así la respuesta inflamatoria sistémica y celular.

La I κ B Kinasa β (IKK β) es una serina/treonina quinasa clave en la vía de señalización canónica del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un complejo proteico que actúa como un regulador maestro de la inflamación, la inmunidad y la supervivencia celular. IKK β es una proteína expresada de forma ubicua, fundamental para la respuesta celular a una amplia variedad de estímulos proinflamatorios y de estrés.

Estructura y Composición

IKK β es un componente catalítico central del complejo IKK, el cual se compone típicamente de tres subunidades:

- IKK α (o IKK1): Otra serina/treonina quinasa con un 52% de identidad de secuencia con IKK β .
- IKK β (o IKK2): La subunidad catalítica principal responsable de la activación de NF- κ B en la vía canónica. Consta de 756 aminoácidos.
- IKK γ (o NEMO): La subunidad reguladora esencial (modulador esencial de NF- κ B), que no posee actividad quinasa, pero es crucial para el ensamblaje, la activación y la estabilidad del complejo.

IKK β , al igual que IKK α , posee varios dominios funcionales críticos:

- Dominio Quinasa (KD): Ubicado en el extremo N-terminal, es el responsable de su actividad catalítica, donde se unen el ATP y el sustrato I κ B α .
- Dominio de Hélice-Bucle-Hélice (HLH): Implicado en interacciones proteína-proteína, incluyendo la dimerización con IKK α y la interacción con IKK γ .
- Dominio de Cremallera de Leucinas (LZ): También participa en la dimerización y en las interacciones dentro del complejo IKK.
- Dominio de Asociación con el Ubiquitinador (UDD) o Dominio de Adaptador C-terminal (C-ADD): Implicado en la regulación de la activación del complejo.

La función principal de IKK β es fosforilar selectivamente a las proteínas inhibidoras del NF- κ B (I κ B), en particular a I κ B α . Esta fosforilación ocurre en residuos específicos de serina (Ser32 y Ser36 en I κ B α) en respuesta a una amplia gama de estímulos proinflamatorios, como:

- Citocinas: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), (IL-1 β).
- Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs): (LPS)
- Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs): Liberados por células dañadas o estresadas.
- Estrés oxidativo.

Cuando IKK β es activada (generalmente por quinasas río arriba en la vía, como TAK1), transfiere grupos fosfato de ATP a los residuos de serina de I κ B α . Esta fosforilación marca a I κ B α para su ubiquitinación (mediada por la ubiquitina ligasa E3 SCF/ β -TrCP) y posterior degradación por el proteasoma 26S. La degradación de I κ B α libera al NF- κ B (generalmente un heterodímero p50/p65) de su secuestro en el citoplasma, permitiendo que su señal de localización nuclear (NLS) quede expuesta. Esto conduce a la translocación de NF- κ B desde el citoplasma hacia el núcleo, donde puede unirse a secuencias de ADN específicas llamadas elementos de respuesta κ B (κ B-RE) en las regiones promotoras de genes diana. La unión de NF- κ B al ADN recluta coactivadores transcripcionales y la maquinaria de transcripción, lo que resulta en la expresión de genes proinflamatorios, incluyendo citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , y enzimas como COX-2 e iNOS. La vía IKK, al activar el NF- κ B, culmina en la unión del heterodímero NF- κ B (más comúnmente p65/RelA y p50/NFKB1) a secuencias específicas de ADN dentro de las regiones promotoras o potenciadoras de los genes diana. Estas secuencias de ADN se conocen como sitios κ B (kappa B) o elementos de respuesta κ B (κ B-RE).

La secuencia consenso generalizada para un sitio κ B al que se une NF- κ B es 5'-GGGRNNYYCC-3', donde:

- G representa Guanina.
- R representa una Purina (Adenina o Guanina).
- N representa cualquier nucleótido (Adenina, Guanina, Citosina o Timina).
- Y representa una Pirimidina (Citosina o Timina).
- C representa Citosina.

Es importante destacar que, si bien esta es la secuencia consenso, existen variaciones significativas en los sitios κ B reales presentes en los promotores de los genes. Diferentes dímeros de NF- κ B (por ejemplo, p65/p50, c-Rel/p50, p50/p50) pueden tener afinidades y especificidades ligeramente distintas por estas variaciones de la secuencia.

La afinidad de unión y la capacidad transcripcional dependen de:

- La secuencia precisa del sitio κ B: Pequeñas variaciones pueden alterar drásticamente la afinidad de unión y la activación.
- El tipo de dímero de NF- κ B: Cada combinación de subunidades (p. ej., p65/p50 vs. c-Rel/p50) tiene preferencias de unión y actividades transcripcionales distintas.
- El contexto cromatínico: La accesibilidad del sitio κ B en la cromatina (si el ADN está enrollado alrededor de histonas o es más accesible) influye enormemente en la capacidad de NF- κ B para unirse.
- Interacciones con coactivadores/correpresores: Una vez unido, NF- κ B recluta otras proteínas que modulan la transcripción.

Ejemplos de Sitios κ B en Genes Proinflamatorios Específicos:

Numerosos genes implicados en la inflamación y la respuesta inmune contienen sitios κ B en sus regiones reguladoras. Algunos ejemplos de genes clave y las secuencias aproximadas de sus sitios κ B incluyen:

- TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alfa): El promotor del gen TNF- α contiene varios sitios κ B, clave para su inducción por NF- κ B.
- IL-6 (Interleucina 6): El promotor de IL-6 posee múltiples sitios κ B. Un ejemplo de secuencia reportada en el promotor de IL-6 es 5'-GGGATTTTCCC-3'.
- iNOS (Óxido Nítrico Sintasa Inducible): Crucial para la producción de óxido nítrico en la inflamación. Su promotor también contiene sitios κ B.
- COX-2 (Ciclooxigenasa-2): Otra enzima clave en la producción de mediadores inflamatorios (prostaglandinas). El promotor de COX-2 es un blanco directo de NF- κ B.
- IL-1 β (Interleucina 1 beta): También regulada por NF- κ B.

VI. CONCLUSIONES

- 6a.** Esta investigación representó la primera ocasión en la que estos epóxidos se obtuvieron de forma separada y se caracterizaron individualmente. Dada su versátil reactividad y su potencial como bloques de construcción quirales, esta metodología sintética es una valorada herramienta para la síntesis enantioselectiva de productos naturales complejos y otras moléculas de interés.
- 6b.** Los resultados demuestran la eficacia de la metodología sintética para obtener epóxidos de carvona con control estereoquímico, lo cual es de gran relevancia para la síntesis de compuestos con potencial actividad biológica, ya que la estereoquímica influye en las propiedades y la actividad de las moléculas.
- 6c.** Esta conclusión resalta la importancia de la metodología sintética para identificar compuestos dónde las carvonas halogenadas. inhiben eficazmente la producción de TNF- α , una citocina proinflamatoria clave en el desarrollo de enfermedades inflamatorias. La capacidad de discriminar compuestos con alta eficacia en la supresión de TNF- α señala un potencial terapéutico significativo.
- 6d.** La Carvona, un compuesto natural presente en plantas como la menta y el comino ha demostrado tener propiedades anticancerígenas en diversos estudios. Si bien la investigación sobre su efecto específico en la viabilidad celular es limitada, existen estudios que sugieren su potencial. Los estudios *invitro* han encontrado que la Carvona puede inhibir el crecimiento de células cancerosas y promover la apoptosis, o muerte celular programada.
- 6e.** La reducción de la viabilidad celular en concentraciones más altas podría estar relacionada con la activación de mecanismos de muerte celular, como la apoptosis o la necrosis.

VII. RECOMENDACIONES

- 7a.** Dado que estos epóxidos se obtuvieron y caracterizaron por primera vez de manera separada, se recomienda investigar su actividad biológica individualmente para determinar si poseen un potencial terapéutico similar al de las carvonas halogenadas.
- 7b.** Ampliar el estudio antiinflamatorio. Se debe profundizar en la capacidad de las carvonas halogenadas para inhibir la producción de TNF- α . Futuros estudios podrían usar inhibidores farmacológicos de las vías NF- κ B y/o MAPK para confirmar los mecanismos de señalización involucrados en la supresión de esta citocina.
- 7c.** Analizar la expresión génica y proteica. Para complementar los hallazgos, se sugiere realizar estudios de expresión génica (qPCR) para medir los niveles de ARNm del gen TNF- α . Además, se recomienda usar la técnica de Western blot para analizar las proteínas clave en las vías de señalización del TNF- α .
- 7d.** Investigar el mecanismo de muerte celular. Para entender la reducción de la viabilidad celular en concentraciones altas, se debe investigar si los compuestos inducen apoptosis o necrosis. Se recomienda usar ensayos como el de Anexina V/PI o medir la actividad de las caspasas.
- 7e.** Confirmar hallazgos en modelos in vivo. Dado que la mayoría de los estudios son in vitro, es crucial realizar estudios en modelos animales para validar la eficacia y seguridad de la carvona y sus derivados en un organismo completo.
- 7f.** Evaluar el potencial anticancerígeno. Los resultados sobre la viabilidad celular sugieren que estos compuestos podrían tener propiedades anticancerígenas. Se recomienda explorar esta faceta investigando su capacidad para inhibir el crecimiento de células cancerosas y promover la apoptosis.
- 7g.** Desarrollar una herramienta de síntesis quiral. La metodología sintética desarrollada para obtener los epóxidos con control estereoquímico es una herramienta valiosa. Se recomienda explorar su uso para la síntesis enantioselectiva de otros productos naturales complejos y moléculas de interés, dada la relevancia de la estereoquímica en la actividad biológica.
- 7h.** Establecer la relación estructura-actividad (SAR). Para optimizar la eficacia, se sugiere realizar estudios sistemáticos de SAR. Esto implica sintetizar y probar una serie de análogos de la carvona con diferentes modificaciones químicas para identificar qué partes de la molécula son cruciales para su actividad antiinflamatoria y anticancerígena. Este enfoque guiará el desarrollo de compuestos más potentes y selectivos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier Health Sciences.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier Health Sciences.
3. Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499-511.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Biología molecular de la célula*. Artmed Editora.
5. Alexander, C., & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and endotoxin shock. *Journal of Endotoxin Research*, 7(3), 167-202.
6. Amor, S., Peferoen, L. A., Vogel, D. Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., & van Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology*, 142(2), 151–166. <https://doi.org/10.1111/imm.12233>
7. Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., International Natural Product Sciences Taskforce, & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
8. Beutler, B., & Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 169-176.
9. Brenes, A., Roura, E., & Catalan, N. (2016). Essential oils in poultry nutrition: main modes of action and recent results. *Animals*, 6(4), 25.
10. Brenes, A., Roura, E., & Centeno, C. (2016). Carvone: A bioactive compound of essential oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 720-738. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.748671>
11. Cavalion, J. L. (2021). Once upon a time, inflammation. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27, e20200147.
12. Chen, J., Lu, M., Jing, Y., & Dong, J. (2006). The synthesis of l-carvone and limonene derivatives with increased antiproliferative effect and activation of ERK pathway in prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(19), 6539-6547. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.013>
13. Clevers, H. (2016). Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165(7), 1586-1597.
14. Damasceno, S. R., Oliveira, F. R., Carvalho, N. S., Brito, C. F., Silva, I. S., Sousa, F. B., Silva, R. O., Sousa, D. P., Barbosa, A. L., Freitas, R. M., & Medeiros, J. V. (2014). Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. *Life Sciences*, 94(1), 58–66.
15. Devendra, B. N., Srinivas, N., & Solmon, K. S. (2012). A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(1), 37–41.
16. Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112(6 Suppl), 321S-329S. [https://doi.org/10.1378/chest.112.6_supplement.321s](https://doi.org/10.1378/chest.112.6_supplement.321s)
17. Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 320(1), 8-27.

18. Dinarello, C. A. (2024). Historical Review of Cytokines. *European Journal of Immunology*, 54(1), e2350615.
19. Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98-107. doi: 10.1038/nri2925
20. Electron Microscopy Sciences. (2024). Neubauer Hemocytometer <https://www.emsdiasum.com/docs/technical/datasheet/68052-14>
21. El-Rufaie, O. E., & Chester, A. C. (2012). Avicenna's Canon of Medicine: A review of the 11th century treatise. *Journal of Islamic Medical Association of North America*, 44(2), 11-14.
22. Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), 356-361.
23. Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., ... & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 9099–9104.
24. Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., & Medina, J. D. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 182-217.
25. Gonçalves, E. C. D., Baldasso, G. M., Bicca, M. A., Paes, R. S., Capasso, R., & Dutra, R. C. (2020). Terpenoids, Cannabimimetic Ligands, beyond the Cannabis Plant. *Molecules*, 25(7), 1567.
26. González, Y., Mojica-Flores, R., Moreno-Labrador, D., Cubilla-Rios, L., Rao, K. S. J., Fernández, P. L., Larionov, O. V., & Lakey-Beitia, J. (2023). Polyphenols with Anti-Inflammatory Properties: Synthesis and Biological Activity of Novel Curcumin Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3691. <https://doi.org/10.3390/ijms24043691>
27. González, Y., Mojica-Flores, R., Moreno-Labrador, D., Pecchio, M., Rao, K. S. J., Ahumado-Monterrosa, M., Fernández, P. L., Larionov, O. V., & Lakey-Beitia, J. (2023). Tetrahydrocurcumin Derivatives Enhanced the Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–Activity Relationship Analysis. *Molecules*, 28(23), 7787. <https://doi.org/10.3390/molecules28237787>
28. González Mosquera, D. M., Hernández Ortega, Y., Fernández, P. L., González, Y., Doens, D., Vander Heyden, Y., Foubert, K., & Pieters, L. (2020). Flavonoids from *Boldoa purpurascens* inhibit proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and the expression of COX-2. *Journal of Ethnopharmacology*, 250, 112456. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112456>
29. Gravetter, F. J., & Wallnau, L. B. (2021). *Essentials of statistics for the behavioral sciences* (10th ed.). Cengage Learning.
30. Guzmán-Gutiérrez, S. L., Quintas, L. E., García-Argáez, A. N., & Navarrete, A. (2015). β -Caryophyllene reduces TNF- α -induced NF κ B activation and interleukin-8 expression in human keratinocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(11), 1544-1553.
31. Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2021). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier Health Sciences.

32. Hannoodee, S., & Nasuruiddin, D. (2020, 12 de marzo). Acute Inflammatory Response. StatPearls.
33. Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229-236. doi: 10.1038/ni.3102
34. Hotamisligil, G. (2006). Inflamación y trastornos metabólicos. *Nature*, 444, 860–867.
35. Ismail, S. M., et al. (2016). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Boswellia serrata* on carrageenan induced paw edema in albino Wistar rats. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(7).
36. Jiang, X., & Liu, H. (2014). 4.07 Electrophilic Cyclization. In *Comprehensive organic synthesis II* (pp. 412-494).
37. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science*. McGraw-Hill Education.
38. Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), 749–759.
39. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384.
40. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2021). *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*. Elsevier Health Sciences.
41. Landsberg, G., Hunthausen, W., & Ackerman, L. (2017). *Behavior problems of the dog and cat*. Elsevier Health Sciences.
42. Lawrence, T., Willoughby, D. A., & Gilroy, D. W. (2002). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Nature Medicine*, 8(12), 1292-1299.
43. Lawrence, T., Willoughby, D. A., & Gilroy, D. W. (2002). Anti-inflammatory signaling and the resolution of inflammation. *The Journal of Immunology*, 168(11), 5663–5669.
44. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2018). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade revisited. *Nature Immunology*, 19(12), 1278–1287.
45. Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100(1), 225–234.
46. Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews*, 65(suppl_3), S140-S146.
47. Libby, P. (2021). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592(7855), 524–533.
48. Luster, A. D. (2020). Chemokines—central regulators of immunity and inflammation. *New England Journal of Medicine*, 382(3), 244-256.
49. Majno, G. (1975). *The healing hand: man and wound in the ancient world*. Harvard University Press.
50. Marques, F. M., Figueira, M. M., Schmitt, E. F. P., Kondratyuk, T. P., Endringer, D. C., Scherer, R., & Fronza, M. (2019). In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF-

- κ B signalling pathway. *Inflammopharmacology*, 27(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0483-z>
51. McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205–2219.
 52. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
 53. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
 54. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969.
 55. Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737.
 56. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846–852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
 57. Nathan, C., & Ding, A. (2010). SnapShot: Reactive nitrogen intermediates. *Cell*, 140(5), 691–691.e1.
 58. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products from around the globe: potential biodiversity contributions to human health. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.
 59. O'Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying T cell effector function. *Science*, 327(5967), 1098–1104.
 60. Oubella, A., Bimoussa, A., Byadi, S., Laamari, Y., Fawzi, M., N'ait ousidi, A., ... & Ait Itto, M. Y. (2023). Cytotoxic and apoptotic effects of some (R)-carvone-isoxazoline derivatives on human fibrosarcoma and carcinoma cells: experimental evaluation for cytotoxicity, molecular docking and molecular dynamics studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(5), 1930–1943.
 61. Pahwa, R., Goyal, A., & Jialal, I. (2023). Chronic Inflammation. In StatPearls. StatPearls Publishing.
 62. Pfeiffer, R. (1892). Cholera Studien. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 5, 705–716.
 63. Piccinini, A. M., & Midwood, K. S. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. *Mediators of Inflammation*, 2010.
 64. Plumb, D. C. (2018). *Plumb's veterinary drug handbook*. John Wiley & Sons.
 65. Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2023). Evolving functions of the vascular endothelium. *Nature Reviews Cardiology*, 20(9), 604–620.
 66. Pombal da Silva, S. M. (2019). Tesis para la obtención del Grado de Doctor en Química (Tesis doctoral, Director: Prof. Dr. Jesús Miguel López Rodilla). Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.
 67. Pombal, S., Tobal, I. E., Roncero, A. M., Rodilla, J. M., Garrido, N. M., Sanz, F., Esteban, A., Tostado, J., Moro, R. F., Sexmero, M. J., Jambrina, P. G., & Diez, D. (2018). Diastereoselective Synthesis of 7,8-Carvone Epoxides. *Catalysts*, 8(6), 250. <https://doi.org/10.3390/catal8060250>

68. Porter, R. (2005). *The Cambridge history of medicine*. Cambridge University Press.
69. Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635-700.
70. Rao, P. V. (2015). Review on biological activities and medicinal properties of terpenes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(1), 22-31.
71. Rather, L. J. (1990). *The genesis of cancer: a historical overview*. Johns Hopkins University Press.
72. Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Physiology and function of glucocorticoid signalling in immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 783–798.
73. Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986–1000.
74. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2023). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 24(1), 18-30.
75. Ridker, P. M. (2007). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 115(3), 356–364.
76. Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., ... CANTOS Trial Group. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119–1131.
77. Rodilla, J. M., Neves, P. P., Pombal, S., Rives, V., Trujillano, R., & Díez, D. (2016). Hydrotalcite catalysis for the synthesis of new chiral building blocks. *Natural Product Research*, 30(7), 834–840. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1075525>
78. Rodríguez Pérez, R. I. (2022). Holistic design of organo- and photocatalyzed novel transformations: Synthesis of thiotrifluoromethylated heterocycles, difluoroalkylated enals, cyclic imines and aminoamides (Tesis doctoral, Director: J. J. Alemán Lara). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
79. Rosales, C. (2020). Phagocytosis: a fundamental process in immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 151.
80. Rufino, A. T., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., & Mendes, A. F. (2015). Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology*, 750, 141–150.
81. Sangetha, R., & Zuraini, A. (2011). Carvone: a review of its pharmacological and toxicological aspects. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(8), 699-722.
82. Sangetha, R., & Zuraini, A. (2011). Evaluation of anti-inflammatory properties of selected medicinal plants on RAW 264.7 macrophage cells. *International Food Research Journal*, 18(4), 1475-1481.

83. Sangetha, S., & Zuraini, Z. (2011). Antiinflammatory and antinociceptive activities of the essential oil of *Mentha arvensis* Linn. in experimental animal models. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(1), 123-127.
84. Serhan, C. N. (2020). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 87–101.
85. Simons, F. E., & Simons, K. J. (2011). Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1139–1150.e4.
86. Sousa, C., Leitão, A. J., Neves, B. M., Judas, F., Cavaleiro, C., & Mendes, A. F. (2020). Standardised comparison of limonene-derived monoterpenes identifies structural determinants of anti-inflammatory activity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64032-1>
87. Sousa, C., Neves, B. M., Leitão, A. J., & Mendes, A. F. (2021). Elucidation of the mechanism underlying the anti-inflammatory properties of (S)-(+)-carvone identifies a novel class of sirtuin-1 activators in a murine macrophage cell line. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070777>
88. Sugio, K., & Tsurufuji, S. (1981). Mechanism of anti-inflammatory action of glucocorticoids: Re-evaluation of vascular constriction hypothesis. *British Journal of Pharmacology*, 73(3), 605-608.
89. Sun, J., Fang, L., & Tillekeratne, L. M. V. (2014). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of d-limonene. *Journal of Natural Products*, 77(12), 2583–2587.
90. Tabas, I., & Glass, C. K. (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, 339(6116), 166-172.
91. Takeo, M., & Hashimoto, T. (2021). Skin Wound Healing and Inflammation. *Journal of Immunology Research*, 2021, 6658517.
92. Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
93. Tizard, I. R. (2018). *Veterinary immunology*. Elsevier Health Sciences.
94. Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420(6917), 853-859.
95. Vestweber, D. (2023). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*, 23(3), 169–185.
96. Ward, P. A. (2010). The inflammatory response—II. *New England Journal of Medicine*, 363(2), 174-179. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004093>
97. Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835–870.
98. Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), 199–210.
99. Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation comes of age. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1027–1034.
100. Zuo, Y., & Li, Y. (2020). Histamine and inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1232, 41-52.