Evaluación de la actividad citotóxica de nanoformulaciones de triterpenos extraídos de las hojas de *Eucalyptus tereticornis* en neutrófilos.

Mario Andrés Medina Rojas

Trabajo de investigación para optar al título de Biólogo

Directora de proyecto de grado

Nancy Jaimes Méndez

Codirectora de proyecto de grado

Diana Yurley Espinel Pabón

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Biología

Pamplona, Norte de Santander

2025

DEDICATORIA

A mi familia, quienes han estado siempre para mí, sin ellos, cumplir este sueño no hubiese sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Nancy Jaimes Méndez por guiarme en esta ardua labor, a mi codirectora Diana Yurley Espinel Pabón por su dedicación y paciencia, a mi profesora Wlda Margarita Becerra Rozo por estar siempre pendiente de mi proceso y por apoyarme en momentos cruciales, a mis amigos por alentarme y apoyarme en este momento importante de mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN 7
ABSTRACT 8
1. INTRODUCCIÓN 9
2. OBJETIVOS 15
2.1. Objetivo general 15
2.2. Objetivos específicos 15
3. MARCO TEÓRICO 16
3.1. Eucalyptus tereticornis 16
3.2. Clasificación y propiedades farmacológicas de los triterpenos 18
3.3. Tejido sanguíneo 23
3.4. Neutrófilos de sangre periférica 26
3.5. Citotoxicidad 27
3.8. Nanoencapsulación y nanopartículas de PLGA 30
3.9. Sistemas de liberación controlada de nanopartículas de PLGA 31
4. METODOLOGÍA 34
4.1. Estandarización del protocolo de aislamiento de neutrófilos 34
4.2. Aislamiento de neutrófilos a partir de muestras de sangre periférica 34
4.2.1. Extracción sanguínea mediante técnica de punción venosa 34
4.2.2. Asilamiento y purificación de los PMN 36
4.3. Nanoformulaciones de triterpenos extraídos del material vegetal de E. tereticornis OBE100 a evaluar 39
4.2.1. Ensayo Citotoxicidad (MTT) 41
4.3. Análisis estadístico 42
5. RESULTADOS 43
5.1. Aislamiento y viabilidad de los neutrófilos 43
5.2. Efecto de las nanoformulaciones de OBE100 sobre la viabilidad de neutrófilos 45
5.1. Viabilidad celular de neutrófilos expuestos a nanoformulaciones de triterpenos de E. tereticornis OBE100 49
6. DISCUSIÓN 51
7. CONCLUSIONES 55
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y FIGURAS

AO: Ácido oleanólico

AU: Ácido ursólico

C5a: Componente 5a del complemento

CD31: Clúster de diferenciación 31

COX-2: Ciclooxigenasa-2

CXCL3: Ligando 3 de la quimiocina del motivo C-X-C

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETS: Enfermedades de transmisión sexual

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

ICAM-2: Molécula de adhesión intercelular 2

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-1: Interleucina 1

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP: Intraperitoneal

JAK/STAT3: Janus quinasa / Transductor de señal y activador de la transcripción 3

LAU: Lactona del ácido ursólico

LTB4: Leucotrieno B4

MAPK: Quinasa activada por mitógenos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NF-kB: Factor nuclear kappa B

NK: Células asesinas naturales (natural killer)

OSM: Oncostatina M

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PLGA: Ácido poliláctico-co-glicólico

QOPN: Química orgánica de productos naturales

Th1: Linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2: Linfocitos T cooperadores tipo 2

Th17: Linfocitos T cooperadores tipo 17

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

RESUMEN

Desde tiempos ancestrales, la humanidad ha utilizado las plantas medicinales por sus propiedades terapéuticas y su impacto positivo en la salud. Entre ellas se destaca el género *Eucalyptus*, el cual se ha empleado tradicionalmente para tratar diversas afecciones, incluida la diabetes y la obesidad, debido a su capacidad para modular la inflamación, disminuir significativamente los niveles de grasa en tejidos y regular las concentraciones de glucosa en sangre. Recientes investigaciones han demostrado que *Eucalyptus tereticornis* contiene un grupo de triterpenos con potencial en el tratamiento de estas enfermedades. Los grupos de investigación en Genética Molecular (GENMOL) y Química Orgánica de Productos Naturales (QOPN) de la Universidad de Antioquia han logrado extraer a partir del material vegetal de *Eucalyptus tereticornis*, un grupo de triterpenos a los cuales denominaron OBE100, compuesto principalmente por ácido ursólico, ácido oleanólico y lactona del ácido ursólico. Dado que, al ser administrado por vía oral, estos compuestos no logran la misma eficacia que por vía intraperitoneal, se optó por encapsularlos en un vehículo polimérico que favoreciera su biodisponibilidad y permitiera un mejor alcance hacia las células diana. Frente al interés creciente en este grupo de triterpenos, surge la necesidad de analizar el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de las nanoformulaciones del extracto natural de *E. tereticornis* OBE100 en neutrófilos de sangre periférica, como paso previo para su aplicación terapéutica. Para ello, se empleó la prueba colorimétrica MTT, mediante la cual se evaluó la viabilidad celular. Los resultados evidenciaron un efecto benéfico al aumentar significativamente la actividad metabólica de los neutrófilos sugiriendo un posible efecto inmunomodulador.

Palabras claves: MTT, nanoformulaciones, neutrófilos, triterpenos.

ABSTRACT

Since ancient times, humanity has used medicinal plants for their therapeutic properties and positive impact on health. Among these, the Eucalyptus genus stands out, which has traditionally been used to treat various conditions, including diabetes and obesity, due to its ability to modulate inflammation, significantly reduce fat levels in tissues, and regulate blood glucose concentrations. Recent research has shown that *Eucalyptus tereticornis* contains a group of triterpenes with potential in the treatment of these diseases. Research groups in Molecular Genetics (GENMOL) and Organic Chemistry of Natural Products (QOPN) at the University of Antioquia have managed to extract from the plant material of *Eucalyptus tereticornis* a group of triterpenes they have named OBE100, composed mainly of ursolic acid, oleanolic acid, and ursolic acid lactone. Since these compounds are not as effective when administered orally as they are when administered intraperitoneally, it was decided to encapsulate them in a polymeric vehicle that would enhance their bioavailability and allow them to better reach the target cells. Given the growing interest in this group of triterpenes, there is a need to analyze the cytotoxic effect of different concentrations of OBE100 nanoformulations on peripheral blood neutrophils as a preliminary step for their therapeutic application. To this end, the MTT colorimetric assay was used to evaluate cell viability. The results showed a beneficial effect by significantly increasing the metabolic activity of neutrophils, suggesting a possible immunomodulatory effect.

*Keywords:*MTT, nanocompounds, neutrophils terpenes.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la obesidad se ha convertido en una de las principales preocupaciones en salud pública a nivel mundial. Este trastorno metabólico, caracterizado por una acumulación excesiva de grasa corporal, acarrea complicaciones que afectan procesos celulares en cascada (OMS, 2022). La obesidad, genera un entorno inflamatorio constante en el organismo, debido a la liberación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina 6 (IL-6) por parte del tejido adiposo. Esta inflamación crónica puede interferir con la acción de la insulina, generando resistencia a esta hormona, y por ende favoreciendo al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (Mendoza et al., 2010). Por otro lado, los casos de diabetes mellitus tipo 2 han aumentado significativamente en las últimas décadas. Se estima que más del 9% de la población mundial padece esta enfermedad, lo que la posiciona como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La diabetes no solo afecta el metabolismo de la glucosa, sino que también altera respuestas inmunológicas, promoviendo procesos inflamatorios crónicos que pueden agravar el estado de salud de los pacientes (OMS, 2022).

En la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos, el estudio de compuestos naturales ha cobrado gran interés debido a su potencial en la regulación de procesos metabólicos y antiinflamatorios. A diferencia de muchos fármacos sintéticos, los compuestos naturales extraídos de plantas suelen actuar con menor riesgo de efectos nocivos, lo que les permite influir en procesos del organismo de forma más segura. Además, gracias a su baja toxicidad y alta tolerancia en dosis adecuadas, se presentan como alternativas saludables con menos efectos secundarios. Entre este grupo de plantas, el género *Eucalyptus* ha sido ampliamente investigado por su riqueza en metabolitos bioactivos, como los triterpenos, que han mostrado propiedades

hipoglucemiantes, antioxidantes y antiinflamatorias (Echeverri, 2022). En particular, se ha identificado que *Eucalyptus tereticornis* contiene una combinación de triterpenos, cuya actividad biológica es prometedora en modelos experimentales de inflamación y metabolismo (Li et al., 2019; Zhang et al., 2019).

En este contexto, la Universidad de Antioquia ha desarrollado investigaciones orientadas a la obtención de triterpenos a partir de las hojas de *Eucalyptus tereticornis* con el objetivo de identificar compuestos bioactivos con potencial terapéutico. Mediante procesos de extracción con disolventes orgánicos y técnicas de purificación, se obtuvo un precipitado del cual se identificó y caracterizó un grupo de triterpenos, entre ellos el ácido ursólico (AU), el ácido oleanólico (AO) y la lactona del ácido ursólico (LAU). Esta fracción rica en triterpenos fue denominada OBE100, la cual inicialmente se evaluó en modelos *in vitro* evidenciándose efectos hipoglicemiantes, hipolipemiantes y antioxidantes. Posteriormente, el extracto fue administrado por vía oral en modelos murinos con obesidad inducida por dieta, con el fin de evaluar sus posibles efectos biológicos (Echeverri, 2022).

Sin embargo, la administración oral no arrojó resultados prometedores, posiblemente debido a la degradación del principio activo antes de alcanzar las células blanco (Acín et al., 2021). Por esta razón, se optó por su administración intraperitoneal (IP), lo cual demostró una mayor eficacia en la reducción del tejido adiposo y la inflamación. No obstante, esta vía no resulta ideal para la escala a niveles clínicos debido a las molestias asociadas en los pacientes, lo que motivó la búsqueda de un vehículo que permitiera conservar la integridad del principio activo y facilitar su llegada a las células diana. En consecuencia, se planteó la necesidad de desarrollar un sistema de liberación que protegiera el compuesto y facilitara su llegada en buenas proporciones a las células. Por ello, el OBE100 fue encapsulado en nanopartículas poliméricas

de ácido poliláctico-coglicolico (PLGA) con el objetivo de reproducir los efectos biológicos observados con la administración IP (Echeverri, 2022).

Las investigaciones demostraron que dichas nanopartículas no comprometen la viabilidad celular y promueven respuestas favorables como la estimulación de la captación de glucosa y la inhibición de la acumulación de lípidos, lo cual sugiere un potencial terapéutico en enfermedades metabólicas e inflamatorias (Espinel, datos no publicados, 2025). Además, las nanopartículas mostraron una alta eficiencia de encapsulación, aproximadamente 81,57 %, lo que refleja una interacción benéfica entre los triterpenos extraídos del material vegetal de *Eucalyptus tereticornis* y el vehículo polimérico utilizado (Cely et al., 2025).

A pesar de los prometedores resultados obtenidos con el OBE100 encapsulado en modelos celulares, aún no se comprenden completamente los efectos que este compuesto produce sobre el sistema inmunológico. Por esta razón, se eligieron células que representaran en gran proporción al sistema inmune, por lo que, los neutrófilos al ser las células leucocitarias más abundantes y tener un rol esencial en la defensa ante patógenos, emergen como los candidatos ideales. Los neutrófilos son células clave en la respuesta inmune innata, desempeñando un rol fundamental en la inflamación y en la eliminación de patógenos (Díaz et al., 2002). Dado que las enfermedades metabólicas y la obesidad están asociadas con un estado inflamatorio crónico que involucran directamente a células del sistema inmune, es crucial evaluar cómo los neutrófilos responden ante las nanoformulaciones de OBE100 para determinar la seguridad de su aplicación terapéutica a futuro.

1.1. Planteamiento del problema y justificación

En los últimos años, las hojas de *Eucalyptus tereticornis* han despertado un creciente interés debido a sus compuestos bioactivos, que incluyen aceites esenciales, polifenoles, taninos y triterpenos, los cuales han demostrado propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas e inmunomoduladoras (Khan, 2019). En este contexto, el grupo de investigación GENMOL y QOPN de la Universidad de Antioquia logró obtener una mezcla de triterpenos a los cuales denominaron OBE100, compuesto principalmente por ácido ursólico, ácido oleanólico y lactona del ácido ursólico (Echeverri, 2022). Esta fracción fue evaluada *in vitro* en diferentes líneas celulares, como C2C12 (mioblastos), 3T3-L1 (adipocitos), HepG2 (hepatocitos) y J774A.1 (macrófagos), donde se observó un aumento en la captación de glucosa, disminución en la acumulación lipídica y reducción del estrés oxidativo (Mejía et al., 2024). Posteriormente, el extracto natural de *E. tereticornis* OBE100 fue administrado por vía oral en modelos murinos con obesidad inducida por dieta; sin embargo, los resultados obtenidos fueron limitados, posiblemente debido a la baja biodisponibilidad del compuesto y su degradación antes de alcanzar las células objetivo (Echeverri, 2022).

Para superar la limitación de la biodisponibilidad, se administró por vía intraperitoneal, la cual mostró efectos antiinflamatorios en el tejido adiposo y favoreció la regulación de la gluconeogénesis de los modelos animales. Sin embargo, esta vía presenta inconvenientes para su aplicación clínica. Con la finalidad de abordar esta problemática, se desarrollaron nanoformulaciones utilizando PLGA, un biopolímero biocompatible, biodegradable y aprobado por la FDA para aplicaciones farmacéuticas, con el objetivo de que el principio activo pueda ser suministrado por vía oral (Echeverri, 2022). Investigaciones previas demuestran que las

nanopartículas pueden aumentar la solubilidad, proteger compuestos bioactivos de la degradación y facilitar su liberación controlada a células diana (Singh et al., 2021).

Además de la actividad metabólica, los triterpenos han demostrado que poseen propiedades inmunomoduladoras, incluyendo la supresión de citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α, así como la neutralización de especies reactivas de oxígeno (Mejía et al., 2024; Renda, 2022). Aunque estos efectos han sido descritos principalmente en macrófagos, adquieren especial relevancia en neutrófilos, dado su papel central como primeros efectores en la respuesta inflamatoria, su abundancia en sangre periférica (50–70% de los leucocitos) y su sensibilidad a modulaciones farmacológicas (Díaz et al., 2002).

A pesar de los avances anteriormente descritos, aún se desconoce el impacto del extracto natural de *E.tereticornis* OBE100 encapsulado en polímeros de PLGA sobre la viabilidad celular de los neutrófilos humanos. En ese sentido, el presente estudio evaluó el efecto de las nanoformulaciones de triterpenos con el extracto natural de *E. tereticornis* OBE100 encapsulado en PLGA sobre la viabilidad de neutrófilos humanos aislados a partir de sangre periférica, utilizando el ensayo MTT y siguiendo los lineamientos establecidos en la norma ISO 10993-5 (Evaluación biológica de dispositivos médicos). Los resultados obtenidos son relevantes, puesto que contribuyen a fortalecer la evidencia disponible sobre la seguridad de estos compuestos. Además, permiten confirmar su efecto sobre células clave del sistema inmunológico, lo cual resulta fundamental para respaldar futuras aplicaciones biomédicas.

En este contexto, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto citotóxico de las nanoformulaciones de triterpenos extraídos de las hojas de *Eucalyptus tereticornis* en neutrófilos de sangre periférica cultivados en modelos *in vitro*?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica de nanoformulaciones de triterpenos extraídos de las hojas de *Eucalyptus tereticornis* en neutrófilos humanos como modelo *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estandarizar el protocolo para el aislamiento y purificación de neutrófilos a partir de muestras de sangre periférica.

2.2.2. Estimar los efectos citotóxicos de las nanoformulaciones de triterpenos provenientes de *Eucalyptus tereticornis* en neutrófilos mediante el ensayo MTT (Tetrazolio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

3. MARCO TEÓRICO

La diabetes y la obesidad son dos enfermedades de gran factor de riesgo que afectan a la salud y la calidad de vida de millones de personas a nivel global. Según datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor del 9,3% de la población mundial presentan dicha afección, de los cuales, el 95% de estos pacientes presentan diabetes mellitus tipo 2. Ambas condiciones están implicadas y relacionadas con el ciclo de la glucosa, que se considera la principal fuente activa de energía para el cuerpo y que a partir de esta misma se derivan ciertos procesos metabólicos a nivel celular (OMS, 2022).

La diabetes mellitus se caracteriza por presentar anomalías en el organismo, estas anomalías van presentadas por altos niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia), debido a la resistencia o deficiencia de la producción de insulina, una hormona que actúa directamente en el ingreso de la glucosa en las células. Por otro lado, la obesidad se puede definir como el exceso de grasa corporal en el organismo, esta se acumula debido al desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, que es la forma más frecuente que se presenta dicha enfermedad (OMS, 2022).

En la actualidad existen diversos estudios en base a las propiedades hipoglucemiantes e hipolipemiantes a partir de extractos oleicos en numerosas especies de plantas. El *Eucalyptus tereticornis* es una especie de eucalipto que ha despertado gran interés en las áreas de la biomedicina por poseer grandes cantidades de triterpenos que se destacan por generar efectos muy positivos en la salud (Echeverri, 2022).

3.1. Eucalyptus tereticornis

El Eucalipto Rojo, conocido científicamente como *Eucalyptus tereticornis*, se erige como un árbol emblemático dentro del género *Eucalyptus*, destacando por su versatilidad y diversas

aplicaciones a nivel mundial. Originario de Australia, donde su presencia es extensa, ha conquistado territorios globales con éxito, demostrando una capacidad única de adaptación a una variedad de entornos. Su imponente estatura, que oscila entre los 20 y 50 metros (**Figura 1)**, lo convierte en un recurso valioso, especialmente por el aprovechamiento de su tronco en actividades agrícolas e industriales, proporcionando una fuente extensa de materia prima (CSIRO, 2004).

El Eucalipto Rojo australiano (*Eucalyptus tereticornis*) no solo se destaca por su dimensión y utilidad estructural, sino que también encuentra en sus hojas un tesoro de propiedades medicinales. Este árbol ha capturado la atención en el ámbito farmacéutico debido a los diversos compuestos antimicrobianos y antiinflamatorios presentes en sus hojas. Este interés creciente resalta la importancia de explorar y aprovechar al máximo las potenciales contribuciones del Eucalipto Rojo en el campo de la salud y el bienestar humano. Las hojas del Eucalipto Rojo (**Figura 1)** son particularmente ricas en triterpenos, compuestos que se encuentran predominantemente en los aceites esenciales extraídos de estas hojas. Estos triterpenos desempeñan funciones vitales para la planta, siendo indispensables para su defensa contra patógenos, actuando como metabolitos secundarios que contribuyen a la adaptación y supervivencia de la especie. Además, participan en procesos como la plasticidad de la membrana celular, lo que contribuye a la resistencia de la planta a herbicidas y otros factores ambientales adversos (CSIRO, 2004).

Figura 1.

Árbol de *Eucalyptus tereticornis* (Autor, 2024)

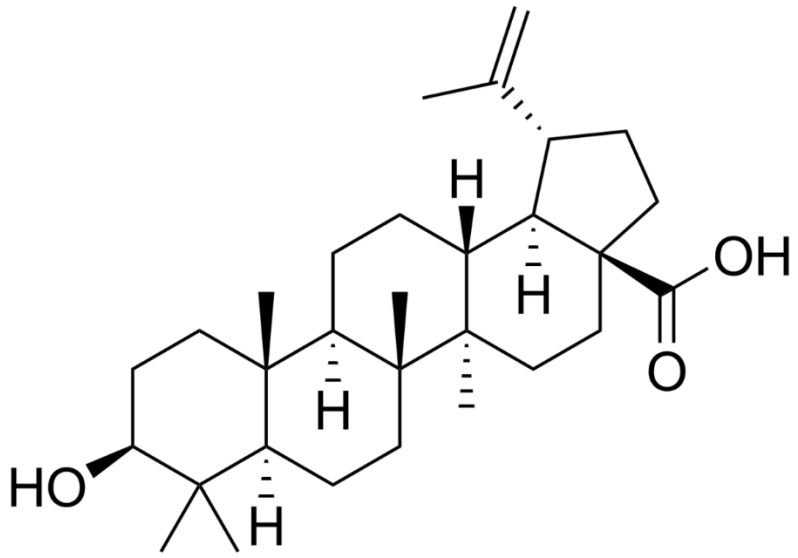


3.2. Clasificación y propiedades farmacológicas de los triterpenos

Los triterpenos son un tipo de metabolito secundario que se encuentra en diversas plantas y tienen una variedad de funciones biológicas. Estos compuestos, que pertenecen a la clase de los terpenoides, desempeñan roles importantes en la supervivencia y adaptación de las plantas en su entorno. Son uno de los compuestos químicos que se encuentran en gran mayoría en las plantas, y que a su vez han demostrado tener diversas propiedades farmacológicas beneficiosas para la salud. Dichos compuestos, se caracterizan por tener una estructura química de anillos tal como se muestra en la **figura 2** (Universidad de Granada, 2004).

Figura 2.

Estructura química de los triterpenos (Sociedad Botánica Ibérica, 2024).



A nivel estructural, se clasifican principalmente en tetracíclicos y pentacíclicos, según el número de anillos que conforman su esqueleto de carbono. Dentro de estos grupos se encuentran diferentes tipos como el oleanano, ursano, lupano, dammarano, cucurbitano, lanostano y otros. Además, existen derivados llamados nortriterpenoides **(Figura 3)**, que se originan por modificaciones estructurales como la oxidación o degradación de triterpenos mayores, y que también presentan gran interés farmacológico tal como se muestra en la **tabla 1** (Renda et al., 2022).

Figura 3.

Clasificación de los triterpenos (Renda et al., 2022).

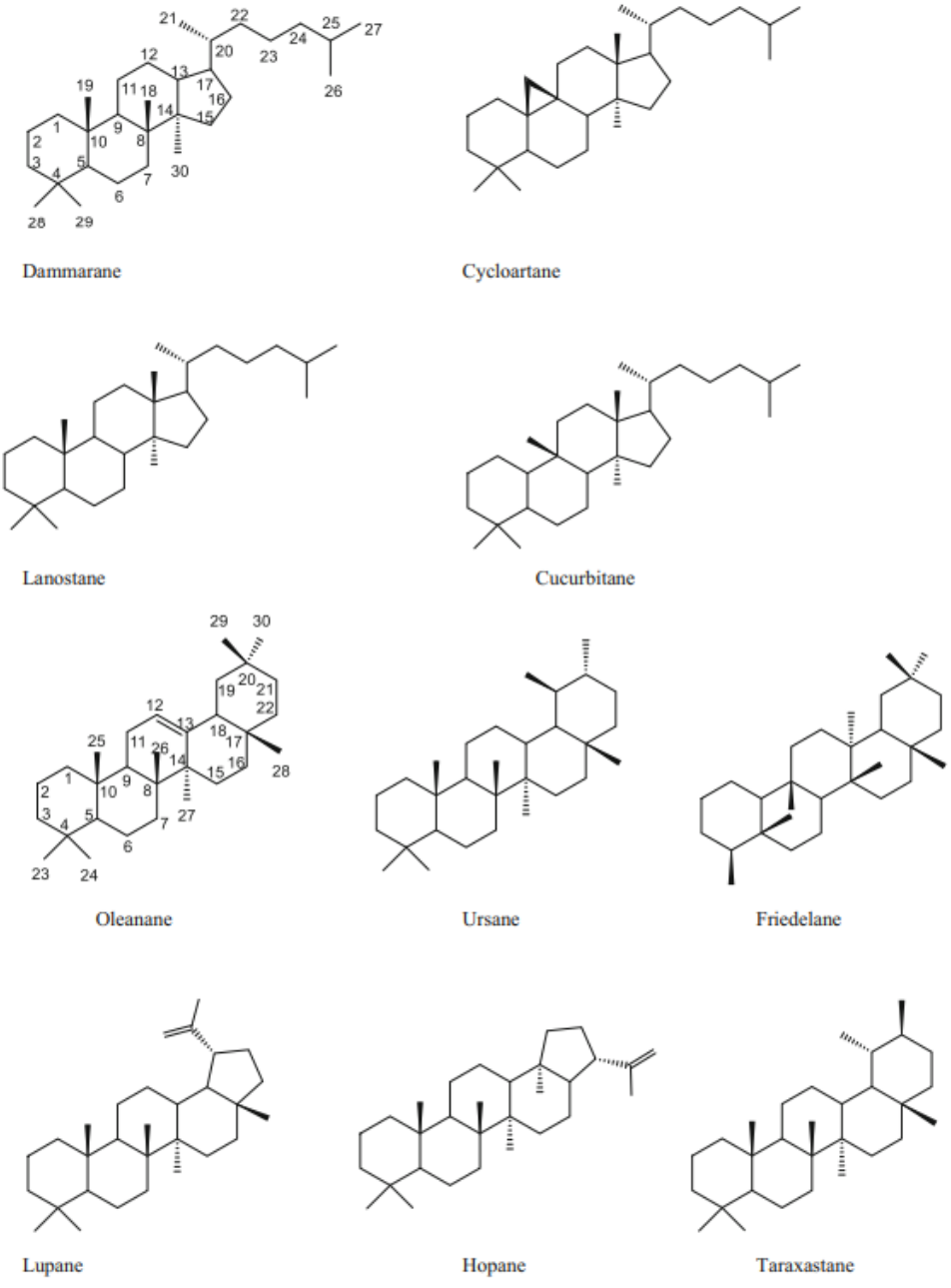


Tabla 1.

Clasificación y propiedades inmunomoduladoras de los triterpenos (Renda et al., 2022).

Triterpenos	Origen / Tipo	Actividad inmunomoduladora
Ácido oleanólico	Oleanano	Inhibe Factor nuclear kappa B (NF-κB), reduce TNF-α e IL-6, efecto antiinflamatorio
Ácido ursólico	Ursano	Inhibe NF-κB y Janus quinasa / Transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK/STAT3), regula los linfocitos T cooperadores tipo 17 (Th17/Treg)
Lupeol	Lupano	Suprime NF-κB, modula los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2), estimula macrófagos
Celastrol	Friedelano	Inhibe JAK/STAT3, regula los Th17 y Treg, reduce inflamación
Pristimerina	Friedelano	Disminuye óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-(2COX-2), suprime TNF-α
Glycyrrhizin / Ác. glicirretínico	Regaliz (*Glycyrrhiza*)	Suprime TNF-α e IL-6, útil en hepatitis y úlceras gástricas
Ácidos boswélicos	*Boswellia serrata*	Inhibe TNF-α, IL-1β, interleucina 1 beta (IL-6), efecto dosis-dependiente
Betulina / Ácido betulínico	*Betula spp.*	Estimula linfocitos T y B, efecto antiviral y antitumoral
Ácidos ganodéricos	*Ganoderma lucidum*	Activa NK, suprime NF-κB, promueve apoptosis de células T activadas
Astragalósidos	*Astragalus spp.*	Activa macrófagos y producción de anticuerpos, regula apoptosis

Cucumariosidos	*Cucumaria japonica*	Activa células NK, promueve fagocitosis

Más allá de su estructura, lo realmente destacable de los triterpenos es su función biológica. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos tienen la capacidad de modular el sistema inmunológico, regulando tanto su activación como su supresión según el contexto. Esto lo logran al intervenir en rutas celulares clave como NF-κB, JAK/STAT y quinasa activada por mitógenos (MAPK), que están involucradas en la producción de citoquinas, la activación de linfocitos T y B, y la función de macrófagos. Gracias a estas propiedades, muchos triterpenos han mostrado potencial para tratar enfermedades inflamatorias, autoinmunes e incluso ciertos tipos de cáncer. Lejos de ser simples metabolitos secundarios, los triterpenos representan una rica fuente de moléculas con aplicaciones terapéuticas en constante exploración (Renda et al., 2022).

Los efectos farmacológicos más relevantes y notables de estos compuestos son la capacidad antiinflamatoria que generan en el organismo, a su vez, se ha demostrado que presentan actividad antioxidante y antivirales (Li et al., 2019), siendo un gran potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas (Zhang et al., 2019).

Estudios previos realizados por GENMOL y QOPN de la Universidad de Antioquia, evidenciaron que las hojas de *Eucalyptus tereticornis* son ricos en triterpenos como el ácido ursólico (AU), el ácido oleanólico (AO) y la lactona del ácido ursólico (LAU) con unas proporciones relativas de 47,6 % de AU, 14,1 de AO % y 16,3 % de LAU, mientras que la fracción restante, aún no identificada, corresponde aproximadamente al 22 % (Acín et al., 2021). Esta fracción rica en triterpenos ha mostrado propiedades hipoglucemiantes, hipolipemiantes y

antiinflamatorias en diversos modelos celulares, incluyendo líneas hepáticas, musculares y adiposas (Echeverri, 2022), así como efectos moduladores en células del sistema inmune, como macrófagos, en estudios posteriores (Mejía, 2024). En modelos animales, el extracto rico en triterpenos de *E.tereticornis* reduce los niveles de ácidos grasos tanto en el hígado como en los adipocitos, lo cual disminuye la resistencia a la insulina y ayuda a reducir la actividad inflamatoria (Echeverri, 2022).

3.3. Tejido sanguíneo

El tejido sanguíneo es un componente esencial del sistema circulatorio en los vertebrados, incluidos los seres humanos. Este tejido especializado desempeña funciones vitales, como la distribución de oxígeno y nutrientes a todo el organismo, la defensa contra infecciones y la reparación de lesiones. Está compuesto principalmente por células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) suspendidas en un fluido denominado plasma, tal como lo describe Kierszenbaum (2012) y se ilustra en la **figura 4**. Estas células se organizan en una compleja red que recorre arterias, venas y capilares, formando un sistema dinámico y eficiente que contribuye a mantener la homeóstasis y respuestas eficaces ante daños o invasores externos. Dichas células se clasifican en:

3.3.1. **Glóbulos Rojos (Eritrocitos):** Son las células más abundantes en la sangre, con alrededor de 4.5 a 5.5 millones/μL. Se encargan de transportar oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos y de llevar dióxido de carbono de vuelta a los pulmones para su eliminación. Se producen en la médula ósea y viven aproximadamente 120 días en el torrente sanguíneo. Miden cerca de 7 a 8 micrómetros de diámetro y carecen de núcleo y orgánulos para proporcionarles más espacio para la hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno.

3.3.2. **Glóbulos Blancos (Leucocitos):** Son mucho menos numerosos que los glóbulos rojos, con una cantidad normal entre 4.000 y 11.000 μL de sangre, tienen un papel fundamental en el sistema inmunológico, ayudando a defender el cuerpo contra infecciones y enfermedades. Al igual que los glóbulos rojos, se originan en la médula ósea y dependiendo del tipo, pueden vivir desde unas pocas horas hasta varios días. Son más grandes que los eritrocitos, midiendo entre 10 y 20 micrómetros. Hay varios tipos de glóbulos blancos según su función:

3.3.3.1. *Neutrófilos:* Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en sangre (40-70% del total) y actúan como primera línea de defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas. Su mecanismo de acción incluye la fagocitosis y neutralización de patógenos. Tienen una vida corta (horas a días) y mueren por apoptosis después de cumplir su función. Su rápida migración a tejidos infectados se debe a señales químicas como quimiocinas.

3.3.3.2. *Linfocitos:* Los linfocitos son las llamadas células de memoria, pueden producir anticuerpos B que reconocen y atacan a patógenos extraños, a su vez, sirven como marcadores celulares para que células especializadas como los macrófagos puedan reconocer y eliminar agentes externos, por otro lado, están los linfocitos T que se encargan de destruir células infectadas, por último, están los linfocitos natural killer o NK, se encargan de destruir células infectadas y tumorales. Pueden durar días o semanas dependiendo del tipo de célula diferenciada.

3.3.3.3. *Monocitos:* Los monocitos representan el 5-10% de los leucocitos en sangre y, al migrar a tejidos, se diferencian en macrófagos. Estas células cumplen funciones críticas como la fagocitosis de patógenos, la presentación de antígenos a linfocitos T y la liberación de citocinas proinflamatorias. Si no se activan suelen demorar aproximadamente de 1 a 3

días, mientras que ya activados como macrófagos, duran en promedio entre semanas y años.

3.3.3.4. *Eosinófilos:* Los eosinófilos (1-3% de los leucocitos) combaten principalmente infecciones parasitarias, especialmente helmintos, mediante la liberación de proteínas tóxicas como la peroxidasa eosinofílica. También están implicados en alergias, donde liberan leucotrienos y citocinas que amplifican la inflamación. Normalmente pueden durar de 1 a 8 horas si se encuentran en sangre, en tejidos suelen tener un promedio de vida de 1 a 2 semanas.

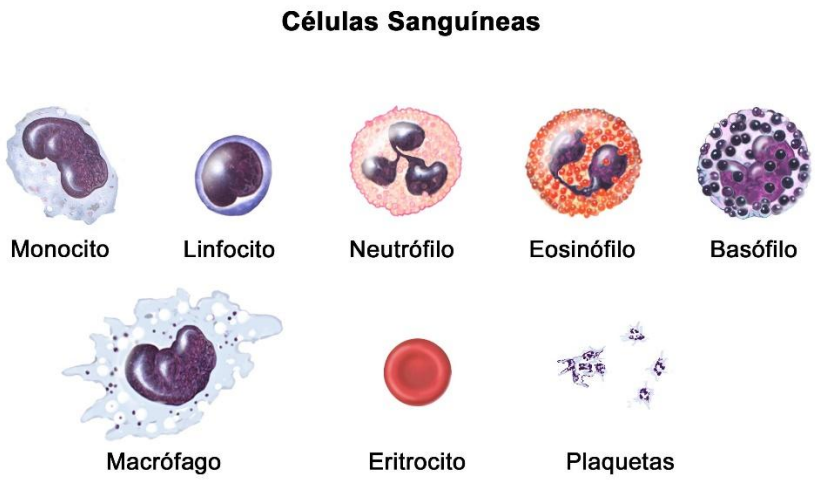
3.3.3.5. *Basófilos:* Los basófilos (<1% de los leucocitos) liberan histamina que es un vasodilatador y heparina que funciona como anticoagulante en reacciones alérgicas e inflamatorias. Expresan Inmunoglobulina E en su superficie, lo que los hace cruciales en respuestas de hipersensibilidad inmediata, como la anafilaxia. Tienen un promedio de horas o de días en caso de alergias persistentes en el organismo.

3.3.4. **Plaquetas (Trombocitos):** Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares, sin núcleo originados en la médula ósea, son esenciales para la coagulación sanguínea. Cuando se produce una lesión vascular, se adhieren rápidamente al tejido dañado gracias a receptores específicos que detectan el colágeno expuesto, activándose y liberando sustancias como adenosín difosfato (ADP) y tromboxano A2 que atraen más plaquetas al sitio. Estas se agregan formando un tapón provisional, mientras simultáneamente inician la cascada de coagulación que convierte el fibrinógeno en fibrina, creando una red sólida que estabiliza el coágulo. Su actividad está finamente regulada por mecanismos anticoagulantes naturales para evitar trombosis, y aunque su vida media es corta (7-10 días), su función es vital: desde prevenir hemorragias hasta participar en procesos

inflamatorios y reparación vascular (Castro & Herrera, 2021).

Figura 4.

Diversidad de las células en el tejido sanguíneo (Tomada de NCI, 2011).



3.4. Neutrófilos de sangre periférica

Los neutrófilos son un tipo crucial de leucocito granulocítico, un componente central del sistema inmunológico innato. Estas células desempeñan un papel fundamental en la defensa del organismo contra infecciones bacterianas y fúngicas. Su producción, maduración, funciones y regulación están finamente ajustadas para garantizar una respuesta inmunológica eficaz. Los neutrófilos se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Este proceso de diferenciación y maduración está regulado por diversas citoquinas y factores de crecimiento, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Grail et al., 1994).

Su caracterización morfológica es muy distintiva, presentan un núcleo lobulado y segmentado en todo el citoplasma celular, se ha propuesto que dicha organización del núcleo ayuda a que esta célula pueda tener una mayor flexibilidad y navegación más eficaz al momento

de trasladarse a las regiones afectadas por patógenos. A su vez, presentan grandes cantidades de cromatina condensada, lo que da el aspecto distintivo de la granularidad. Los neutrófilos desempeñan funciones esenciales para el organismo, están encargados de la fagocitosis de agentes invasores que no son viables para el organismo como los hongos, bacterias y otros residuos celulares y a su vez en la participación de la regulación inmunológica del cuerpo (Díaz et al., 2002).

3.5.Citotoxicidad

La citotoxicidad, entendida como la capacidad de una sustancia para causar daño a organismos vivos, es un área crítica en la investigación y regulación de productos químicos en diversos campos, desde la medicina y la industria farmacéutica. Dicha reacción depende de la naturaleza, la dosis y la duración de la exposición a la sustancia, así como de las características de las células afectadas (Cidón, 2021).

El estudio de la citotoxicidad celular se realiza mediante diferentes métodos experimentales, que permiten evaluar los efectos de una sustancia sobre las células *in vitro* o *in vivo*. Algunos de los métodos más utilizados son los ensayos de viabilidad, proliferación, apoptosis, necrosis, estrés oxidativo, inflamación, genotoxicidad y mutagenicidad celular. Estos ensayos se basan en la medición de diferentes parámetros bioquímicos, moleculares o morfológicos que reflejan el estado de las células expuestas a la sustancia (Arencibia, et al., 2003).

En el ámbito de la evaluación biológica de materiales, la norma ISO 10993 constituye un referente internacional fundamental para garantizar la seguridad de dispositivos y compuestos médicos que estarán en contacto con sistemas biológicos. Dentro de esta normativa, la parte 5 (ISO 10993-5) se centra en la evaluación de citotoxicidad *in vitro*, a través de ensayos que

permiten identificar efectos adversos en líneas celulares expuestas a los materiales de estudio (Organización Internacional de Normalización, 2009).

3.6. Ensayo MTT

El ensayo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro) es una técnica colorimétrica ampliamente empleada para evaluar la viabilidad celular, así como para determinar la citotoxicidad de compuestos químicos, extractos naturales o formulaciones nanotecnológicas. Su principio se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir el MTT, un tetrazolio amarillo, a formazán, un producto cristalino de color púrpura insoluble, mediante la acción de enzimas mitocondriales de tipo oxidorreductasa. Este proceso de reducción es directamente proporcional al número de células vivas, por lo que la intensidad de color generada representa un indicador cuantitativo de viabilidad. Luego de la incubación con el reactivo MTT, se añade un disolvente como el dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán, permitiendo así su lectura espectrofotométrica a una longitud de onda generalmente de 570 nm (Risset et al., 2016).

El ensayo MTT no solo permite discriminar entre células vivas y muertas, sino que también se emplea para calcular la concentración citotóxica media (CC_{50}), que corresponde a la concentración de una sustancia capaz de reducir la viabilidad celular en un 50%. La citotoxicidad se clasifica comúnmente de la siguiente manera: viabilidad entre 100-75% indica un efecto no citotóxico; 74-50%, ligeramente citotóxico; 49-25%, moderadamente citotóxico; y menos del 25%, extremadamente citotóxico. Esta metodología ha sido adaptada en diversos estudios para evaluar la toxicidad de nanopartículas, fármacos y extractos vegetales, siendo una herramienta esencial en la investigación biomédica y toxicológica por su sensibilidad, rapidez y bajo costo (Gallegos, 2023).

3.7. Estudios citotóxicos en neutrófilos

Los neutrófilos son células efectoras del sistema inmune innato cuya activación está acompañada por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas proinflamatorias como IL-1β e IL-6 y enzimas proteolíticas, lo que los convierte en mediadores clave tanto en la defensa como en la inflamación tisular (Geering & Simon, 2011). En ese sentido, los neutrófilos han adquirido gran relevancia en la investigación de compuestos con actividad inmunomoduladora, ya que representan de manera efectiva al sistema inmunitario innato y se caracterizan por su elevada abundancia en sangre periférica, así como por su facilidad de aislamiento y manipulación en estudios *in vitro* (Díaz et al., 2002). Estas características los convierten en un modelo celular ideal para evaluar la respuesta inflamatoria y la citotoxicidad inducida por diferentes compuestos bioactivos. Investigaciones recientes han empleado neutrófilos para estudiar los efectos inmunomoduladores de diversas moléculas, evidenciando cambios en la producción de citocinas, la generación de especies reactivas de oxígeno y la modulación de la apoptosis celular (Patel et al., 2021).

En el año 2003 un grupo de investigadores de la Universidad Federal de Ceará, en Brasil, lograron evaluar diferentes compuestos oleicos extraídos de tres familias diferentes del género *Eucalyptus*, el *Eucalyptus citriodor*, *Eucalyptus tereticornis* y *Eucalyptus globulus*, en ratones experimentales, a partir de lo cual demostraron que la totalidad de aceites esenciales tienen una gran efectividad en la reducción de la inflamación y poseen acción analgésica, así, como la disminución significativa de la migración de neutrófilos hacia las cavidades peritoneales del ratón que genera la permeabilidad vascular y así evitar la vasoconstricción (Silva et al., 2003).

Recientemente, Mahboubi y Mokarin (2024) han reportado que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, rico en 1,8-cineol, ejerce efectos antiinflamatorios y analgésicos mediante

la inhibición de citoquinas proinflamatorias a través de la vía TREM-1/MKP-1, además de modular canales iónicos como TRPM8 y TRPA1. Estos mecanismos podrían interferir con la activación y migración de neutrófilos, sugiriendo un potencial efecto inmunomodulador (Mahboubi & Mokari, 2024).

Adicionalmente, se ha reportado que la curcumina, principal compuesto bioactivo de la cúrcuma (*Curcuma longa*), inhibe la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y reduce la producción de ROS y citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF-α en modelos *in vitro*, destacando su potencial como agente fitoterapéutico para modular la activación de neutrófilos en contextos inflamatorios (Zhu et al., 2023).

Estos métodos han demostrado ser eficaces para identificar cambios en la viabilidad celular inducidos por compuestos inmunomoduladores o proinflamatorios, y han sido ampliamente validados en diversos tipos celulares, incluidos neutrófilos humanos. En este contexto, el presente estudio emplea el ensayo MTT como herramienta para evaluar el impacto citotóxico de nanoformulaciones de triterpenos encapsulados en PLGA, considerando la alta reactividad de los neutrófilos como un indicador confiable de efectos celulares.

3.8. Nanoencapsulación y nanopartículas de PLGA

La nanoencapsulación es una técnica altamente utilizada en la encapsulación de compuestos bioactivos, principalmente medicinales en partículas poliméricas que brindan una mayor protección, ayudan a controlar su liberación con mayor eficacia y mejorar la biodisponibilidad en el organismo (Soppimath et al., 2001). Existen diversos componentes para generar polímeros diseñados para la encapsulación, entre los más destacados está el polímero PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico), el cual es uno de los más utilizados para la nanoencapsulación de fármacos.

Las nanopartículas de PLGA se preparan comúnmente mediante emulsificación y evaporación del solvente. Se pueden encapsular tanto medicamentos hidrofílicos como hidrofóbicos con alta eficiencia de encapsulación (Danhier et al., 2012). El tamaño de partícula, carga superficial, morfología y perfil de liberación se pueden ajustar variando parámetros como el peso molecular del PLGA, la relación lactida/glicólida, el uso de surfactantes, entre otros (Astete et al., 2006).

Una de las principales ventajas de la encapsulación en PLGA incluyen la protección del compuesto activo contra degradación, aumento de la solubilidad de fármacos hidrofóbicos, liberación controlada, mejora de la farmacocinética y biodistribución, y facilitación del transporte a través de epitelios y membranas biológicas. Las nanopartículas de PLGA se han utilizado para encapsular fármacos antitumorales, antiinflamatorios, antibióticos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Danhier et al., 2012).

Estudios recientes como los adelantados por la Universidad de Antioquia realizaron la encapsulación de la mezcla de triterpenos obtenidos del *E. tereticornis* OBE100 en nanopartículas de PLGA, con el objetivo de optimizar la administración oral del compuesto bioactivo, mejorando su estabilidad y eficacia en modelos experimentales (Escobar et al., 2022).

3.9. Sistemas de liberación controlada de nanopartículas de PLGA

En la mayoría de los sistemas de liberación controlada, se introduce el fármaco, pesticida u otro agente biológico en lo que comúnmente se conoce como transportador, siendo este generalmente un material polimérico. La velocidad de liberación de la sustancia deseada está mayormente determinada por las propiedades del polímero, aunque también existen factores secundarios de menor impacto, como el pH del entorno donde se llevará a cabo la liberación. Considerando estos aspectos, es viable desarrollar sistemas de liberación que actúen de manera

gradual y continua a lo largo de períodos prolongados. A este mecanismo de liberación se le conoce como metabolismo de primer paso, el cual consiste en que el compuesto viaja por las vías gastro-intestinal donde allí se metabolizan con la ayuda del hígado (Sáez, 2004).

El recorrido de dicho compuesto puede estar mediado por diferentes factores, entre estos se encuentran la permeación, disolución, transporte activo, flujo de salida, entre otros. En base a los mecanismos de transporte anteriormente mencionados, se necesita tener una compatibilidad moderada con el polímero para que este pueda ejercer su mecanismo de acción. Una de las barreras que limita en gran parte el paso de las sustancias en nuestro cuerpo es el sistema inmunológico, este está constituido por una variedad de células, las cuales están subdivididas en base a la función a realizar en el cuerpo, por lo que resulta importante comprender cómo responde este sistema ante la presencia de fármacos, con el fin de entender los mecanismos mediante los cuales el cuerpo los metaboliza y determinar si dichos compuestos alcanzan efectivamente su sitio de acción (Grumezescu, 2017).

Por otro lado, los sistemas de liberación controlada de fármacos han sido ampliamente estudiados en los últimos años como una estrategia efectiva para mejorar la biodisponibilidad, estabilidad y eficacia terapéutica de diversos compuestos bioactivos. Dentro de estos sistemas, el uso de polímeros biodegradables ha cobrado especial relevancia, destacándose el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) como uno de los más utilizados por su biocompatibilidad, capacidad de degradarse en productos no tóxicos como el ácido láctico y ácido glicólico, y su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para aplicaciones biomédicas (Lancheros Salas, 2016).

El PLGA es un copolímero lineal sintético compuesto por unidades de ácido láctico y ácido glicólico, cuya proporción molar puede ser modificada para ajustar la tasa de degradación

del material y, en consecuencia, la cinética de liberación del fármaco. En general, una mayor proporción de ácido láctico tiende a ralentizar el proceso de hidrólisis, mientras que un mayor contenido de ácido glicólico lo acelera. Además, el peso molecular del polímero también incide en la velocidad de degradación; a mayor peso molecular, mayor estabilidad y más prolongada será la liberación del principio activo (Soppimath et al., 2001).

El proceso de liberación del fármaco desde las nanopartículas de PLGA ocurre principalmente por tres mecanismos interrelacionados: la difusión inicial del compuesto encapsulado, la degradación hidrolítica del polímero, y la erosión de la matriz polimérica. Inicialmente, el agua penetra en el sistema, permitiendo la salida del fármaco que se encuentra cerca de la superficie de las partículas. Posteriormente, a medida que el polímero se degrada por acción del agua, se forman poros que permiten una liberación más sostenida del compuesto hacia el medio circundante. Finalmente, cuando la matriz se erosiona significativamente, se libera el remanente del fármaco atrapado (Makadia & Siegel, 2011).

Este proceso de liberación suele presentar una fase bifásica o trifásica: una liberación rápida inicial, seguida por una fase de liberación sostenida, y eventualmente una etapa final en la que la degradación del polímero se acelera. En el estudio desarrollado por Lancheros Salas (2016), la liberación de N-acetilcisteína (NAC) desde nanopartículas de PLGA mostró este comportamiento, con una liberación significativa en las primeras 1.5 horas y una reducción progresiva en la tasa de liberación durante las 24 horas siguientes.

4. METODOLOGÍA

4.1.Estandarización del protocolo de aislamiento de neutrófilos

El protocolo de aislamiento de neutrófilos fue estructurado a partir de metodologías previamente descritas por Cui et al. (2021), Oh et al. (2008), Muñiz-Buenrostro et al. (2020) y Kuhns et al. (2015), siendo este último fundamental para la implementación del dextrán al 6% en solución salina como agente de sedimentación. Durante el proceso de estandarización, se realizaron modificaciones específicas a los tiempos de incubación, volúmenes y velocidades de centrifugación, con el fin de optimizar la recuperación celular, minimizar la activación espontánea (Zhu et al., 2023) y garantizar la viabilidad de los polimorfonucleares.

4.2.Aislamiento de neutrófilos a partir de muestras de sangre periférica

Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre periférica de 5 donantes masculinos y fueron aislados mediante un protocolo de separación por gradiente de densidad que combina sedimentación con dextrán al 6% y centrifugación en Ficoll (1.077 g/mL), los detalles serán presentados más adelante.

4.2.1. Extracción sanguínea mediante técnica de punción venosa

Para la obtención de las muestras sanguíneas, se aplicaron los criterios de selección de donantes detallados en la **tabla 2,** conforme a lo propuesto por el autor Hernández, 2021, realizando algunas modificaciones.

Tabla 2.

Criterios de inclusión para donantes de sangre (adaptado de Hernández, 2021).

Criterios de selección de donantes
Edad entre los 18 y 25 años.
Donantes exclusivamente hombres, no mujeres debido a los cambios en las respuestas celulares por los cambios hormonales.
Que no padezcan enfermedades crónicas ni enfermedades de transmisión sexual (ETS).
No fumadores
Que no hayan consumido bebidas alcohólicas ni sustancias alucinógenas en las últimas 48 horas.
No se hayan realizado tatuajes o perforaciones en los últimos seis meses.
No consuman medicamentos de forma regular.
Toma de muestra por horas de la mañana, entre las 7 y 8 am.

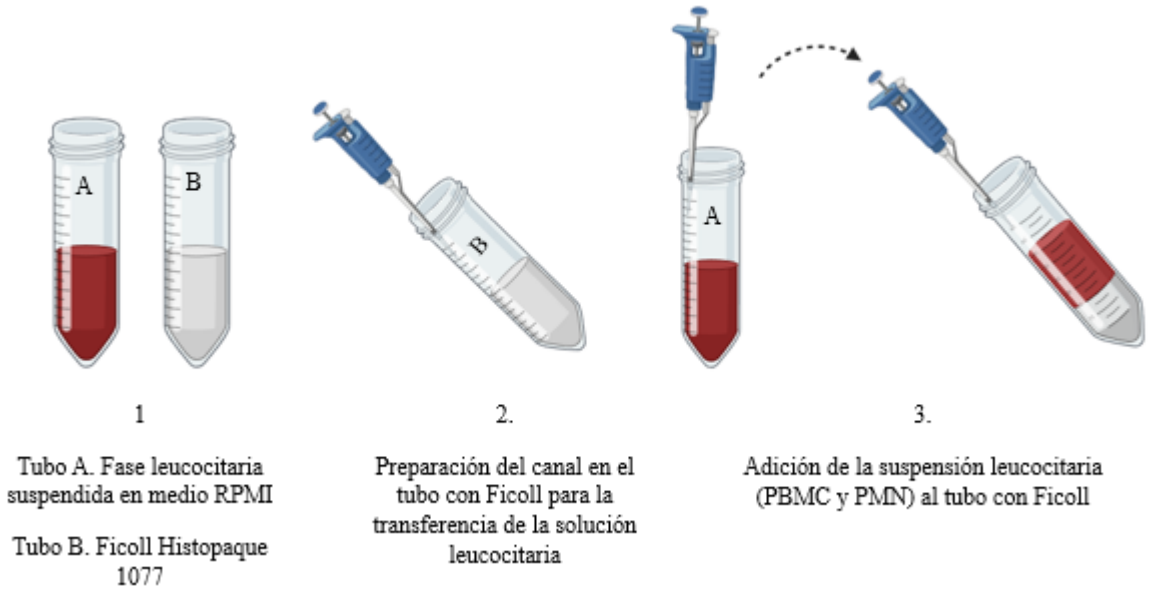
Para la recolección de la sangre, se utilizaron tubos Vacutainer® con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Por cada donante, se recolectaron 4 tubos de 4mL para un total de 16mL de sangre y se agitaron mediante la técnica de inversión para evitar la coagulación sanguínea dentro del tubo. Posteriormente, se transfirió el contenido de los tubos Vacutainer a dos tubos Falcon ® de 15mL (8mL por tubo aproximadamente). Realizado lo anterior, se procedió a separar las células sanguíneas por diferenciación de gradientes hasta obtener los PMN (células polimorfonucleares) como se describirá a continuación:

4.2.2. Asilamiento y purificación de los PMN

Para la purificación de los polimorfonucleares (PMN), se adicionaron 1600µL de solución dextran al 6% preparada en solución salina al 0,9% en cada tubo Falcon ® que contienen los 8mL de sangre correspondientes al **apartado 4.1.** Posteriormente, la solución resultante (sangre + dextran) se llevó a incubar a 37°C, 95% de humedad relativa (Hr) y 5% CO_2 en posición vertical durante 30 minutos, con el fin de favorecer la sedimentación de los eritrocitos y permitir la visualización de la fase leucocitaria en la parte superior del tubo. Transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo la capa superior evitando la contaminación con los eritrocitos y se transfirió a un tubo Falcon® estéril para luego ser suspendida en 2mL de medio Roswell Park (RPMI) Sigma 1640. A continuación, la suspensión de leucocitos se depositó lentamente sobre un tubo Falcon® con Ficol Histopaque 1077 en proporciones 1:1, vertiéndola por las paredes, evitando la mezcla de las dos fases tal y como se presenta en la **figura 5**.

Figura 5.

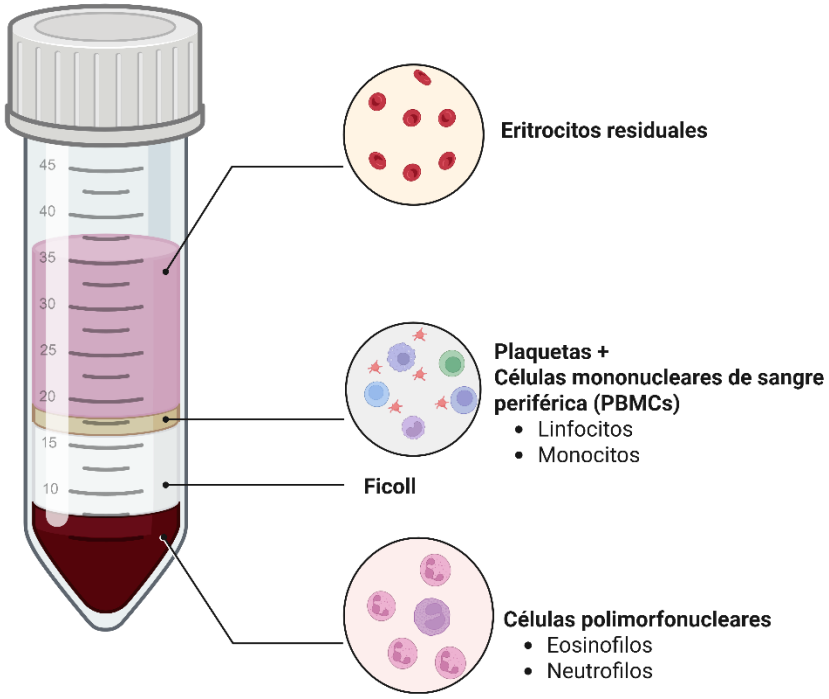
Representación esquemática del procedimiento para la transferencia de las fases que contiene los PBMC y PMN sobre el Ficoll Histopaque 1077 (Autor, 2024).



Posteriormente, la fracción leucocitaria de PBMC y PMN se centrifugó con Ficoll Histopaque 1077 a temperatura ambiente a 1800 RPM durante 30 minutos. Finalizado el tiempo, se obtuvo la separación de los diferentes grupos celulares por la diferencia de densidades (**figura 6**). En la capa inferior se ubicaron los PMN seguidos por la capa de Ficoll Histopaque 1077 que se encuentra la parte intermedia. En la capa superior, se encuentran los PBMC, que en este caso no hicieron parte experimental del presente estudio.

Figura 6.

Representación de las distintas fases posterior a la centrifugación (Autor, 2025).



Después de esta etapa, se procedió a descartar con precaución el sobrenadante hasta obtener el pellet que alberga los PMN. Posteriormente, se realizaron lavados con medio Roswell Park (RPMI) Sigma 1640 a 2000 RPM a 4°C hasta obtener una muestra libre de residuos celulares que interfieran en la efectividad de los ensayos.

Una vez completado el paso anterior, se procedió a realizar la técnica lisis osmótica en tres ciclos consecutivos empleando agua destilada fría estéril con el fin de eliminar completamente los eritrocitos residuales y garantizar una alta pureza de la muestra. Pasados 30 segundos, la muestra se centrifugó a 2000 RPM durante 5 minutos a 4°C. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y las células resultantes se suspendieron en 1mL de medio Roswell Park (RPMI) Sigma 1640, utilizado para mantener la viabilidad celular durante el manejo *in vitro* y

proporcionar las condiciones fisiológicas necesarias para los posteriores tratamientos experimentales. Luego, se determinó la viabilidad celular empleando el ensayo de exclusión con azul tripano, un colorante vital que penetra únicamente en células con membranas dañadas, permitiendo así diferenciar células viables (excluyen el colorante) de células muertas (tiñen su citoplasma de azul) (Gallegos, 2023). A partir del conteo, se aplicó el siguiente cálculo:

$$\% \text{ de Viabilidad celular: } \frac{número\ de\ células\ viables}{número\ de\ células\ totales} * 100$$

Para estimar la concentración celular, se aplicó esta ecuación, donde *fd* representa el factor de dilución utilizado durante el recuento:

$$\text{Cel/mL: } \frac{número\ de\ células}{4} * fd * 10000$$

Finalmente, se determinó el volumen requerido para sembrar las células en la placa de 96 pozos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cel*mL/pozo: } \frac{número\ de\ células}{36\ pozos}$$

4.3.Nanoformulaciones de triterpenos extraídos del material vegetal de E. tereticornis OBE100 a evaluar

Las nanoformulaciones evaluadas en este estudio, denominadas M12300, M22300 y M42300/CP2300 fueron suministradas por el grupo de investigación GENMOL y QOPN de la Universidad de Antioquia. Estas nanoformulaciones están compuestas por triterpenos extraídos de hojas de *Eucalyptus tereticornis*, encapsulados en nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

En el presente estudio se evaluaron dos nanopartículas de triterpenos extraídos del material vegetal de *E. tereticornis* OBE100 encapsuladas en PLGA, identificadas como M12300,

M22300. El polímero de PLGA empleado para la encapsulación tiene un peso molecular de 2300 gr/mol. Las designaciones M1 y M2 corresponden a la variación de proporciones empleadas entre los triterpenos extraídos del material vegetal de *E. tereticornis* OBE100 y el PLGA, siendo 12mg de OBE100/60mg de PLGA para M1 y 20mg de OBE100/100mg de PLGA para M2, mientras que M4 está compuesta únicamente por PLGA (100mg) (**Tabla 3)** el cual permitirá conocer la influencia del principio activo frente al control polímero (M42300/CP2300) (Cely et al., 2025). Para la preparación de las soluciones de trabajo, se realizaron diluciones a partir de una solución madre. Se pesaron 0.8 mg de cada nanoformulación (M12300, M22300 y M42300), los cuales se disolvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma) para obtener una concentración stock inicial de 800 µg/mL. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas en medio RPMI 1640 para obtener las concentraciones finales de 600, 400, 200 y 100 µg/mL. Todas las diluciones se prepararon bajo condiciones estériles, con homogenización vigorosa mediante micropipeteo entre cada dilución para garantizar la completa dilución de las nanoformulaciones.

Tabla 3.

Composición molecular de las nanoformulaciones de OBE100 a evaluar.

Nanoformulación	Composición (OBE100/PLGA)	Porcentaje de encapsulación	Peso PLGA (g/mol)	Concentraciones evaluadas (µg/mL)
M12300	12mg:60mg	81,569%	2300	600, 400, 200 y 100
M22300	20mg:100mg	79,152%	2300	600, 400, 200 y 100
M42300/CP2300	100mg PLGA	N/A	2300	600, 400, 200 y 100

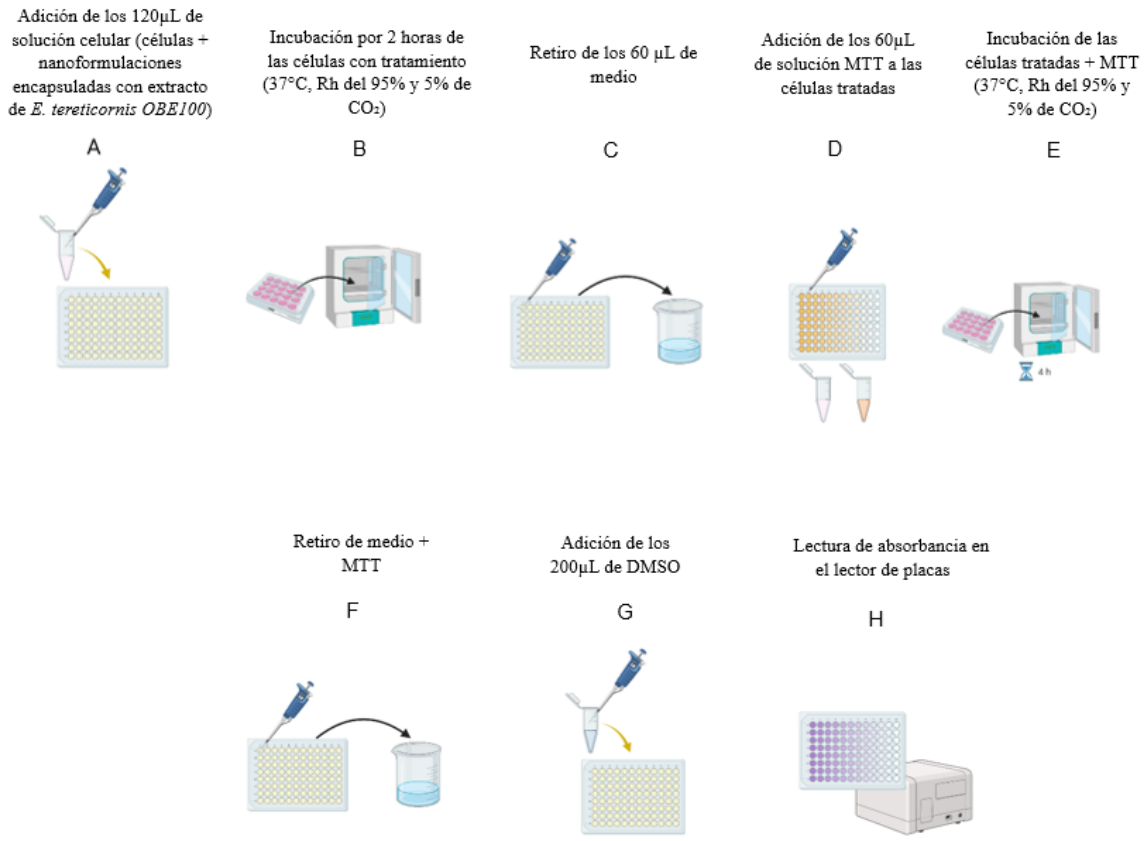
4.2.1. Ensayo Citotoxicidad (MTT)

Con los neutrófilos previamente aislados, se realizó el ensayo MTT, una prueba colorimétrica clave para evaluar la viabilidad celular con precisión. En una placa de 96 pozos, se sembraron aproximadamente 145,000 células/pozo (25µL de suspensión celular) por triplicado y se añadieron 100µL de las diferentes concentraciones de las nanopartículas encapsuladas con triterpenos de *E. tereticornis* OBE100 (600, 400, 200 y 100 µg/mL). La placa se incubó a 37°C, con una Hr del 95% y una atmósfera de 5% de CO_2 durante 2 horas, permitiendo que el tratamiento actuara sobre la población celular. Posteriormente, se retiraron cuidadosamente 60µL del medio y se añadieron 60 µL de solución MTT (5mg/mL preparado en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). Finalmente, las células fueron incubadas nuevamente a 37°C, 95% de Hr y 5% de CO_2 durante 4 horas.

Después del tiempo de incubación, se retiraron 60µL del medio, y se añadieron 200µL dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán. La placa se agitó manualmente durante 1 hora, asegurando la completa disolución de los cristales. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570nm correspondiente al máximo de absorción del formazán, producto de la reducción del MTT por enzimas mitocondriales activas (**Figura 7**) en el lector de placas BioTek Instruments EPOCH. Para el cálculo de la viabilidad celular relativa, los valores de absorbancia obtenidos en los pozos tratados con las diferentes concentraciones de las nanoformulaciones de triterpenos de *E. tereticornis* OBE100 (600, 400, 200 y 100 µg/mL) fueron comparados con los controles negativos, estableciendo estos últimos como el 100% de viabilidad celular.

Figura 7.

Representación gráfica de los pasos para el ensayo MTT (Autor, 2024).



4.3. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± desviación estándar. Previo al análisis comparativo, se verificó la normalidad de la distribución mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$). Para evaluar diferencias entre grupos se empleó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 10.4.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

5. RESULTADOS

5.1.Aislamiento y viabilidad de los neutrófilos

El aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica es un paso fundamental en estudios de citotoxicidad, ya que la viabilidad y homogeneidad de las células obtenidas influyen directamente en la confiabilidad de los resultados (Díaz et al., 2002). En este estudio se llevó a cabo la estandarización de un protocolo de aislamiento de neutrófilos humanos, basado en procedimientos previamente descritos en la literatura, que combinan la sedimentación con dextrán al 6 % y la centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque® 1077. Esta estandarización incluyó ajustes propios en los tiempos de incubación, número de lavados y condiciones de centrifugación, con el fin de obtener una población celular homogénea, viable y funcional para su uso en ensayos de citotoxicidad, tal como se presenta en la tabla 4.

Tabla 4.

Modificaciones de reactivos/equipos para la estandarización del protocolo de extracción (Autor, 2024).

N ensayos	Reactivo/equipo	Modificación	Número de células	% Viabilidad
3	Ficoll Histopaque 1077	Proporción 3:1	1'030.000cel/mL	87,85%
3	Dextran	600µL por 5mL de Sangre	1'030.000cel/mL	87,85%
7	Dextran	1mL por 5mL de Sangre	680.000cel/mL	80,00%
7	Ficoll Histopaque 1077	Proporción 1:1	2'140.000cel/mL	81,99%
1	Centrifugadora	Se cambia de equipo	2'200.000cel/mL	99,31%
7	Sangre	16mL de Sangre	5'750.000cel/mL	99,31%

Esta metodología, ampliamente validada en la literatura (Kuhns et al., 2015), permite la separación eficiente de los componentes sanguíneos, obteniendo una fracción enriquecida en

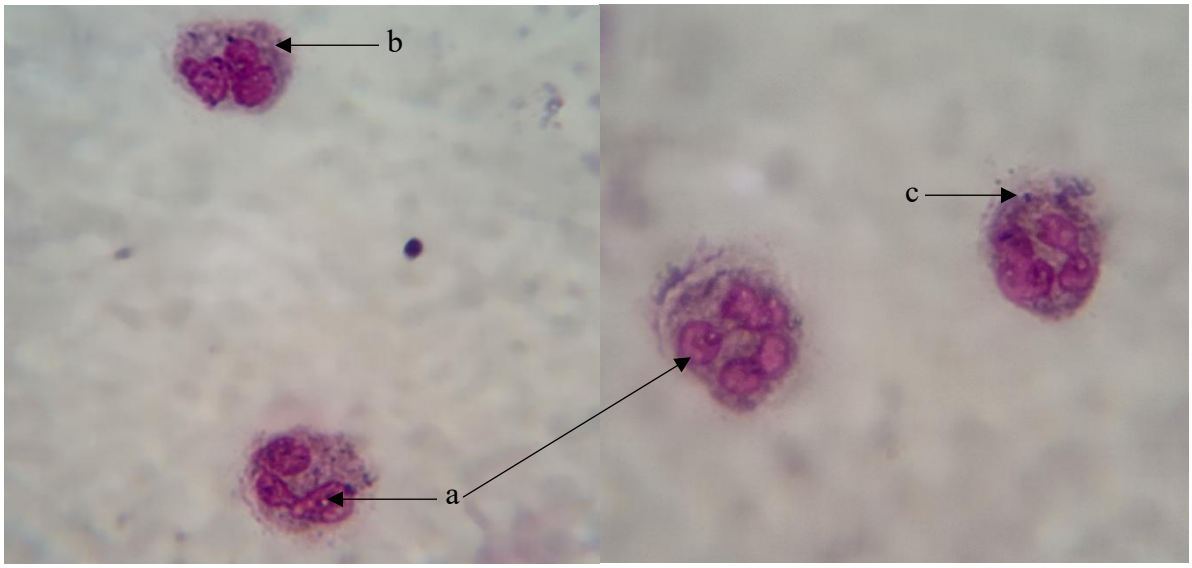
neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Esta estrategia permitió la separación efectiva de los polimorfonucleares a partir de la capa leucocitaria, asegurando una adecuada homogeneidad de la población celular obtenida. En promedio, se recuperaron aproximadamente 5’750.000cel/mL por muestra, con una viabilidad superior al 99 % según el recuento por exclusión con azul tripano. Al ser evaluados morfológicamente mediante tinción con la técnica de Wright y observación al microscopio óptico, los neutrófilos presentaron núcleos segmentados con dos a cinco lóbulos conectados por puentes delgados de cromatina, y un citoplasma de tonalidad rosada clara, sin alteraciones visibles, lo que confirma la integridad estructural y el éxito del procedimiento de aislamiento, tal como se presenta en la **figura 8**.

Estos resultados confirman la efectividad del protocolo estandarizado, asegurando la obtención de neutrófilos homogéneamente estructurales y viables, y en concentraciones adecuadas, garantizando así la reproducibilidad de los ensayos posteriores. Esta condición es fundamental para la fiabilidad de los ensayos citotóxicos. La combinación de sedimentación con dextrán y centrifugación en gradiente de densidad no solo optimizó el aislamiento de neutrófilos de sangre periférica, sino que también evitó la formación de agregados macroscópicos en la suspensión celular, lo que sugiere una minimización de la activación espontánea (Zhu et al., 2023). Estas características cumplen con los requisitos metodológicos establecidos para el ensayo planteado.

Figura 8.

Micrografía de neutrófilos aislados a partir de sangre periférica humana, teñidos con Wright y observados bajo microscopía óptica 1000x (Autor, 2024).

a. Núcleos multilobulados unidos entre sí por puentes de cromatina, b. citoplasma celular, c. gránulos citoplasmáticos.



5.2. Efecto de las nanoformulaciones de OBE100 sobre la viabilidad de neutrófilos

Con el propósito de determinar la actividad citotóxica de las nanoformulaciones de triterpenos extraídos de *Eucalyptus tereticornis*, se llevó a cabo el ensayo MTT en neutrófilos aislados de sangre periférica humana. Se evaluaron tres tratamientos de las nanoformulaciones extraídas a partir del material vegetal de *E. tereticornis*: M12300, M22300 y M42300 (control polímero – CP2300), cada uno a concentraciones de 600, 400, 200 y 100µg/mL. Los tratamientos M12300 y M22300, que contienen el extracto de *E. tereticornis* OBE100 encapsulado en nanopartículas, mostraron un incremento en la viabilidad celular respecto al

control en la mayoría de las concentraciones evaluadas. En varios casos, los porcentajes de viabilidad superaron el umbral del 100%.

Por el contrario, el tratamiento M42300, conformado únicamente por el polímero PLGA sin principio activo, presentó una tendencia variable en la viabilidad celular. En algunas concentraciones (Tabla 4), los valores descendieron hasta un 96,30% ± 7.76, mientras que en otras alcanzaron niveles cercanos al 120%.

Tabla 4.

Porcentaje de viabilidad de neutrófilos expuestos a nanoformulaciones de triterpenos de *E. tereticornis* OBE100 (Autor, 2025).

Concentración	Tratamiento	Viabilidad (%) ± DE
600 µg/mL	M12300	125.34 ± 11.26
	M22300	111.93 ± 8.37
	M42300	103.61 ± 15.43
400 µg/mL	M12300	119.72 ± 4.55
	M22300	115.70 ± 4.15
	M42300	96.30 ± 7.76
200 µg/mL	M12300	110.95 ± 10.66
	M22300	117.43 ± 10.72
	M42300	107.18 ± 18.00
100 µg/mL	M12300	114.79 ± 11.43
	M22300	112.34 ± 14.93
	CP2300	124.67 ± 23.46
Células sin tratamiento	Control negativo	100.00 ± 0.00

Nota: Valores expresados como media ± DE (n = 3). Los datos cumplieron con los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, $p > 0.05$) y homogeneidad de varianzas ($p = 0.891$). El análisis ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos y control ($p = 0{,}273$).

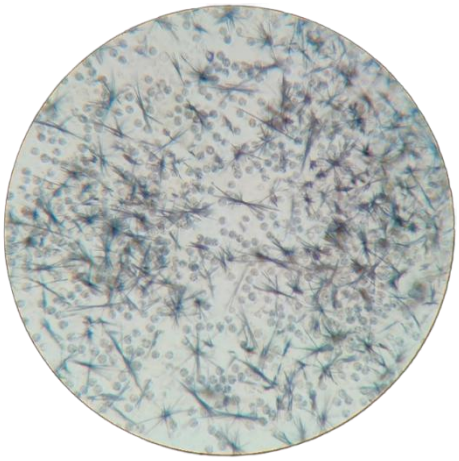
Estos resultados preliminares evidencian que las nanoformulaciones que contienen OBE100 (M12300 y M22300) no solo conservan la viabilidad celular, sino que en ciertas

condiciones podrían favorecer la actividad metabólica de los neutrófilos, en comparación con el polímero sin el extracto de *E. tereticornis* y el control, teniendo en cuenta los datos de la tabla 4. Asimismo, se evidencia la actividad metabólica celular a través de la formación de cristales formazán tal como se observa en la **figura 9**, cuya concentración estimada muestra una tendencia creciente con el aumento de la concentración del tratamiento. Esta relación sugiere que, a mayor concentración, mayor es la actividad mitocondrial de los neutrófilos para los tratamientos M12300 y M22300.

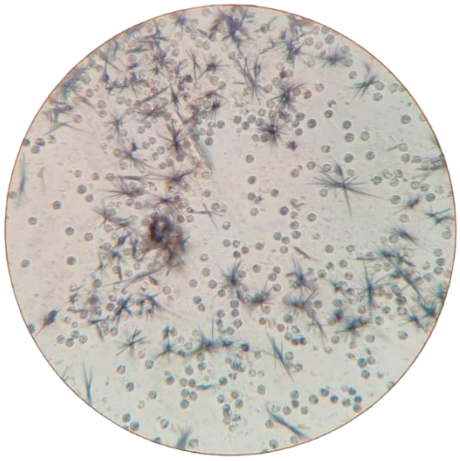
Figura 9.

Fotografías microscópicas (400x) de los neutrófilos expuestos a las nanopartículas encapsuladas con el extracto de *E. tereticornis* OBE100 mediante el ensayo MTT (Autor, 2025).

A. M12300 (600 µg/mL).



B. M12300 (400 µg/mL).

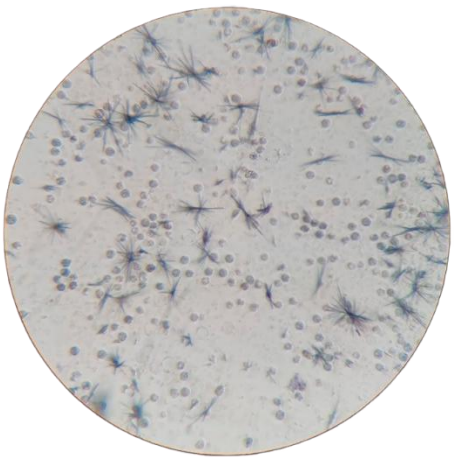


C. M12300 (200 µg/mL).

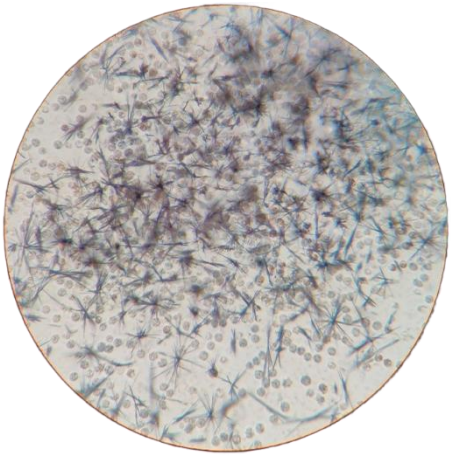
D. M12300 (100 µg/mL).



E. M22300 (600 µg/mL).



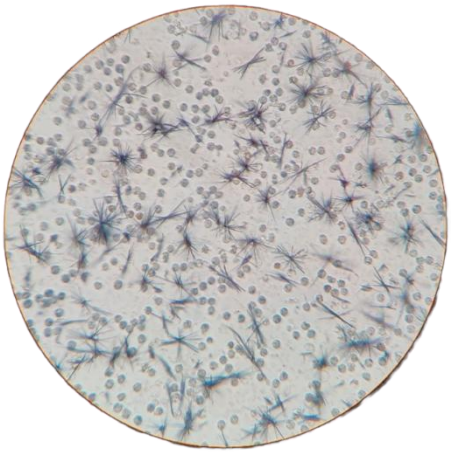
F. M22300 (400 µg/mL).

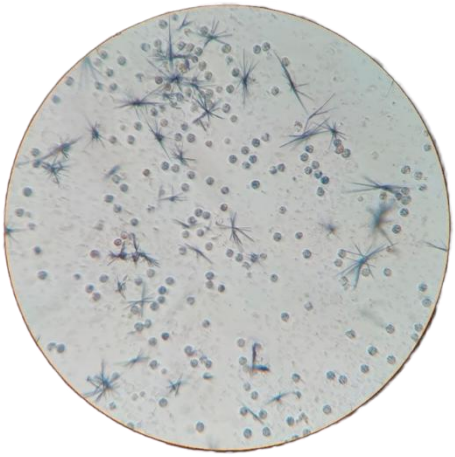


G. M2 2300 (200 µg/mL).



H. M2 2300 (100 µg/mL).





5.1. Viabilidad celular de neutrófilos expuestos a nanoformulaciones de triterpenos de E. tereticornis OBE100

Se procedió con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), cuyo resultado arrojó un valor de $F = 1.307$ con un valor de $p = 0.2728$. Este resultado indica que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control ($p > 0.05$). El valor de R^2 fue de 0.3763, lo cual sugiere que el 37.63% de la variabilidad de los datos puede atribuirse a los efectos del tratamiento, mientras que el resto podría deberse a variaciones biológicas o experimentales.

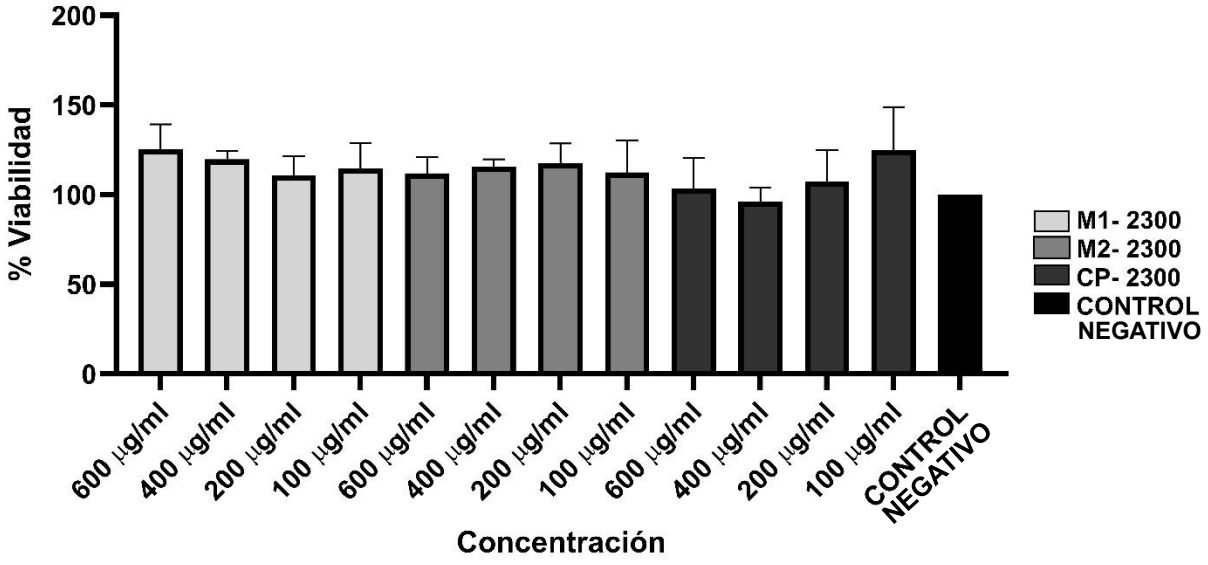
Aunque todas las comparaciones resultaron no significativas ($p > 0.05$), se observan tendencias en los datos. Por ejemplo, los tratamientos con M12300 y M22300 mostraron valores de viabilidad celular que en muchos casos superaron el 100%, mientras que el tratamiento M42300 (formulación con solo PLGA) presentó los niveles de viabilidad más bajos dentro del rango evaluado, especialmente a concentraciones intermedias.

Estas observaciones también se reflejan en la gráfica de barras (**Figura 10**), donde se muestra el porcentaje de viabilidad celular relativa para cada concentración y tratamiento. Los resultados revelan que los tratamientos con OBE100 presentaron comportamientos diferenciados: M12300 mantuvo viabilidades consistentemente superiores al control (125.34 ± 11.26% a 600µg/mL, 119.72 ± 4.55% a 400µg/mL, 110.95 ± 10.66% a 200µg/mL y 114.79 ± 11.43% a 100µg/mL), mientras que M22300 mostró un patrón similar (111.93 ± 8.37% a 600µg/mL, 115.70 ± 4.15% a 400µg/mL, 117.43 ± 10.72% a 200µg/mL y 112.34 ± 14.93% a 100µg/mL). En contraste, M42300 (CP2300) registró valores cercanos o inferiores al control negativo (células cultivadas únicamente con medio de cultivo) (103.61 ± 15.43% a 600µg/mL, 96.30 ± 7.76% a 400µg/mL, 107.18 ± 18.00% a 200µg/mL), excepto a 100µg/mL donde superó

significativamente la viabilidad (124.67 ± 23.46%). Estos datos sugieren que la presencia del compuesto OBE100 en las formulaciones M12300 y M22300 podría estar promoviendo la actividad metabólica celular, efecto que no se observa con el tratamiento M42300.

Figura 10.

Efecto de las nanoformulaciones de triterpenos sobre la viabilidad celular de neutrófilos (Autor, 2025).



Nota: Porcentaje de viabilidad relativa evaluado mediante el ensayo MTT en neutrófilos tratados con diferentes concentraciones (100, 200, 400 y 600µg/mL) de las formulaciones M12300, M22300 y CP2300. El control negativo corresponde a células no tratadas (únicamente con medio) considerado como 100% de viabilidad.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se observó que las nanoformulaciones de triterpenos extraídos del material vegetal de *E. tereticornis* OBE100 influyen de manera diferenciada en la viabilidad de neutrófilos humanos en modelos *in vitro*, dependiendo tanto del tipo de formulación como de la concentración utilizada. Específicamente, los tratamientos M12300 y M22300, que incorporan el extracto de *E. tereticornis* OBE100, evidenciaron un incremento en la actividad metabólica celular en comparación con el control negativo. Este fenómeno sugiere una posible estimulación en la proliferación o activación funcional de los neutrófilos.

Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han demostrado la capacidad que tienen los triterpenos en influir en las funciones celulares. Por ejemplo, Echeverri Chica (2022), reportó que extractos ricos en triterpenos derivados de *E. tereticornis* redujeron la acumulación de lípidos en células hepáticas, indicando una capacidad bioactiva de estos compuestos sobre funciones celulares específicas. Así mismo, Ceballos Duque (2017), evaluó la actividad de fracciones ricas en triterpenos de *E. tereticornis* sobre marcadores inmunometabólicos en tejido adiposo de ratón, encontrando una modulación positiva en la expresión de estos marcadores, lo que sugiere efectos antiinflamatorios y un potencial terapéutico en enfermedades metabólicas. De manera similar, el estudio realizado por Mejía et al., (2024) donde evaluaron las nanoformulaciones de OBE100 en macrófagos activados en células humanas y de murinos para determinar la expresión de genes, encontraron que esta fracción de triterpenos son capaces de suprimir sustancialmente la acción de citocinas inflamatorias como lo son la IL6, IL1, OSM, quimiocinas (CXCL3), mediadores inflamatorios (MMP8 y MMP13) y la vía de señalización JAK-STAT, lo que, de cierto modo, se ve reflejado el potencial inmunomodulador de estos compuestos.

En cuanto al control polímero M42300, compuesta únicamente por PLGA sin triterpenos, mostró valores de viabilidad celular relativamente bajos en comparación con las nanoformulaciones que contienen OBE100. Sin embargo, estos valores no representan un daño funcional evidente en las células, ya que no se observaron alteraciones morfológicas ni una inhibición crítica de la viabilidad celular, especialmente al compararlos con los tratamientos encapsulados que contienen OBE100. Por tanto, se infiere que el polímero por sí solo no ejerce un efecto nocivo significativo que comprometa la integridad celular. Esto sugiere que los resultados observados en las otras formulaciones pueden atribuirse específicamente a los compuestos bioactivos presentes en OBE100 (AU, AO, LAU) y no al vehículo polimérico. Esta diferencia respalda la evidencia de que los triterpenos presentes en las hojas de *E. tereticornis* ejercen un efecto regulador o estimulante sobre la viabilidad celular.

Los análisis estadísticos mediante ANOVA no revelaron diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas, particularmente en las concentraciones más elevadas, en este caso las de 600 y 400µg/mL. Sin embargo, se observó una tendencia creciente en la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de las formulaciones con OBE100, lo que podría indicar una relación dosis - respuesta positiva contrastando con los estudios realizados por Cely et al., (2025). Este patrón también se reflejó en las observaciones microscópicas, donde se evidenció una mayor cantidad de cristales de formazán, producto de la reducción del MTT por enzimas mitocondriales activas en los tratamientos con mayor concentración, especialmente en M12300 y M22300 (**Figura 9**), sin embargo, tal como se presenta en la **figura 10**, se puede detallar que la nanoformulación M12300 tiene una tendencia más homogénea en comparación con los resultados de M22300, lo que podría estar relacionado con la variabilidad en la liberación

de los triterpenos y su efectividad en la encapsulación que corresponde 81.569% para M1 y 79.152% para M2 (Cely et al., 2025).

Es importante considerar que el incremento significativo en la viabilidad celular, reportado en el ensayo MTT, podría estar influenciado por factores técnicos, como errores en el pipeteo o la pérdida de células durante el lavado. Esto es especialmente relevante en el caso de los neutrófilos, dado que no son células adherentes (Pérez et al., 2020) y pueden ser fácilmente removidos durante la manipulación del medio. No obstante, el patrón consistente de mayor viabilidad celular en los tratamientos que contienen OBE100 sugiere que este fenómeno va más allá de simples errores técnicos o sobreestimación estadística por sobredensidad celular de los neutrófilos.

Investigaciones adicionales han señalado que los triterpenos vegetales poseen propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes (Khan, 2019), que podrían explicar el aumento en la actividad mitocondrial observado en los tratamientos con OBE100, lo que les permite interactuar con diversas rutas celulares, incluyendo aquellas relacionadas con la señalización de citocinas, el estrés oxidativo y el metabolismo energético. Estos compuestos pueden activar vías de señalización como NF-κB y MAPK, promoviendo la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante y la supervivencia celular (Renda et al., 2022). En comparación con los resultados obtenidos en esta investigación, donde se evidenció un incremento en la actividad mitocondrial en los tratamientos con OBE100 medido a través de la absorbancia en el ensayo MTT, se infiere que este efecto podría estar relacionado con la capacidad de los triterpenos de estimular el metabolismo celular y mejorar la función mitocondrial de los neutrófilos. De esta manera, los datos sugieren que el incremento de la

absorbancia no sería un error experimental, sino un reflejo real de un estímulo biológico sobre las células inmunes.

Estos hallazgos preliminares abren la posibilidad de considerar a los triterpenos como compuestos bioactivos con potencial terapéutico en la modulación del sistema inmune, particularmente a través de formulaciones nanoestructuradas que podrían mejorar la biodisponibilidad del compuesto activo cuando se viaja a través del organismo, logrando así, una mayor eficacia en la absorción de los compuestos. Estos resultados sugieren que las nanoformulaciones de OBE100 podrían tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias metabólicas, aunque, se recomienda realizar más investigaciones en otros grupos celulares del sistema inmune para comprender de mejor forma los efectos biológicos que se puedan generar.

7. CONCLUSIONES

El protocolo estandarizado para el aislamiento de neutrófilos mediante sedimentación en gradiente de densidad con dextrán al 6% y Ficoll Histopaque 1077 demostró ser altamente eficaz, permitiendo obtener una población celular de polimorfonucleares altamente homogéneos con características propias como dos a cinco lóbulos conectados por puentes delgados de cromatina, y un citoplasma de tonalidad rosada clara, sin presentar alteraciones visibles, permitiendo mantener la integridad celular deseada, así mismo, viabilidades mayores al 99%, condiciones óptimas para estudios de citotoxicidad. La alta recuperación celular y la mínima activación previa aseguran la confiabilidad y reproducibilidad de los ensayos, demostrando ser una metodología robusta para evaluar los efectos de compuestos como los triterpenos extraídos de las hojas de *Eucalyptus tereticornis* OBE100 sobre células del sistema inmunológico. Estos resultados confirman que el procedimiento empleado es adecuado para estudios funcionales, proporcionando una base sólida para futuras investigaciones que apliquen ensayos con nanocompuestos.

En contraste, las nanoformulaciones M12300 y M22300 derivadas de OBE100 mostraron un efecto estimulante significativo sobre los neutrófilos. Los análisis demostraron que ambas formulaciones incrementaron consistentemente la viabilidad celular y la actividad metabólica mitocondrial, aunque M12300 exhibió un perfil más homogéneo y reproducible (**Figura 10**). Este patrón de respuesta sugiere que los triterpenos presentes en OBE100 actuarían como moduladores específicos de la proliferación y activación de polimorfonucleares, destacando particularmente el potencial terapéutico de M12300.

Estos hallazgos sustentan que estas nanoformulaciones representan una estrategia farmacológica prometedora para el desarrollo de terapias dirigidas a enfermedades con componente inflamatorio e inmunometabólico, particularmente en el manejo de la obesidad y diabetes mellitus tipo 2.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acín, S., Muñoz, D. L., Guillen, A., Soscue, D., Castaño, A., Echeverri, F., & Balcazar, N. (2021). Triterpene-enriched fractions from *Eucalyptus tereticornis* ameliorate metabolic alterations in a mouse model of diet-induced obesity. *Journal of Ethnopharmacology*, *265*, 113298. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113298

Antonio, M.-B., Alma Y, A.-M., Edgar I, M.-Z., Rubi C, C.-M., & Maricruz J, M.-R. (2020). Simplified Neutrophil Isolation Protocol. *International Journal of Immunology and Immunotherapy*, *7*(1). https://doi.org/10.23937/2378-3672/1410041

Arencibia, D., Rosario, L., & Curveco, D. (2003). *Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia: algunas consideraciones y su utilidad* [Documento en línea]. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/242644724

Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 17*(3), 247–289. https://doi.org/10.1163/156856206775997322

Bada, R. A. (2022, 23 de noviembre). *Diseño y obtención de polimerosomas para el encapsulamiento y liberación controlada de principios activos* [Ponencia]. Encuentro de Becaries de Posgrado de la UNLP (EBEC 2022), La Plata, Argentina.

Bishayee, A. (2011). Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience, 16*(1), 980–996. https://doi.org/10.2741/3730

Castro, O., & Herrera, J. (2021). Mecanismos moleculares de la activación plaquetaria: implicaciones clínicas. *Medicina Interna de México, 34*(2), 190-205. https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.1908

Cely Garcia, M. C., Espinel Pabón, D. Y., Jaimes Mendez, N., Balcazar Morales, N., & Murillo Ruiz, E. A. (2025). Encapsulation of *Eucalyptus tereticornis* extract in polylactic-co-glycolic acid nanoparticles: standardization, optimization and cell viability. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 97(2). https://doi.org/10.1590/0001-3765202520241069

Cidón, B., & Mendia, C. M. (2021). *Tema 5. Toxicodinamia* [Material docente]. Universidad del País Vasco. https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/56497/mod_resource/content/5/Tema%205.Toxicolog%C3%ADa.pdf

CSIRO. (2004). *Eucalyptus camaldulensis Dehnh. (Eucalipto rojo)* [Archivo web]. https://web.archive.org/web/20060815035031/http://www.cmis.csiro.au/healthycountry/CCScience/TB/eucalyptus-camaldulensis/index.html

Cui, C., Schoenfelt, K. Q., Becker, K. M., & Becker, L. (2021). Isolation of polymorphonuclear neutrophils and monocytes from a single sample of human peripheral blood. *STAR Protocols*, *2*(4), 100845. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100845

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release, 161*(2), 505–522. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043

Díaz, P., Ocampo, A., & Fernández, J. (2002). Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, 7*(3), 206–214. http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv7_i3_p206.pdf

Echeverri Chica, A. (2022). Evaluación del efecto de un extracto rico en triterpenos obtenido a partir de hojas de *Eucalyptus tereticornis* sobre la acumulación de grasa en células hepáticas. 2022 [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.

Gallegos-Hernández, G. F. (2023). Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad. VIDSUPRA. Ciencia, Tecnología y Sociedad, 10(1), 8–9. Instituto Politécnico Nacional. https://www.ipn.mx/assets/files/ciidirdurango/docs/vidsupra/revistas/vs-v10n1.pdf

Geering, B., & Simon, H.-U. (2011). Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death & Differentiation*, *18*(9), 1457–1469. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.75

Grumezescu, A. M. (Ed.). (2017). *Nano- and microscale drug delivery systems: Design and fabrication*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2016-0-02239-8

Instituto Nacional del Cáncer. (2011). *Diccionario de cáncer del NCI: Glóbulo rojo*. https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/globulo-rojo

Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2020). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (8th ed.). Garland Science.

Jiménez Marín, Y. (2022). *Estudio de la función de la proteína PATJ en neutrófilos en el contexto del ictus isquémico* [Tesis de maestría]. Universidad de las Islas Baleares. https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/160344/Jimenez_Marin_Yaiza.pdf

Khan, M. A., Singh, M., & Negi, P. S. (2019). Bioactive compounds from *Eucalyptus*: Pharmacology and potential applications. *Industrial Crops and Products, 133*, 118-132. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.012

Kuhns, D. B., Priel, D. A. L., Chu, J., & Zarember, K. A. (2015). Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Current Protocols in Immunology*, *111*(1). https://doi.org/10.1002/0471142735.im0723s111

Kierszenbaum, A. L. (2012). Histology and cell biology: An introduction to pathology (3rd ed.). Elsevier Mosby. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07842-9.00001-6

Li, Y., Zhang, J., Liu, X., & Wang, Y. (2019). *Anti-inflammatory triterpenes from Eucalyptus globulus: Isolation, characterization, and mechanism of action*. **Phytochemistry**, *158*, 91-102. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.012

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers, 3(3), 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377

Mejia-Garcia, A., Fernandez, G. J., Echeverri, L. F., Balcazar, N., & Acin, S. (2024). RNA-seq analysis reveals modulation of inflammatory pathways by an enriched-triterpene natural extract in mouse and human macrophage cell lines. *Heliyon*, *10*(2), e24382. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24382

Mendoza, E., Rodríguez, A., González, J., García, M., & Méndez, F. (2010). *La obesidad como un proceso inflamatorio*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-11462010000200002&script=sci_arttext

Mahboubi, M., & Mokari, Z. (2024). The Efficacy of *Eucalyptus globulus* Essential Oil in the Management of Pain. *International Journal of Pain*, *15*(2), 70–79. https://doi.org/10.56718/ijp.24-019

Oh, H., Siano, B., & Diamond, S. (2008). Neutrophil Isolation Protocol. Journal of Visualized Experiments, 17. https://doi.org/10.3791/745

Organización Internacional de Normalización. (2009). *ISO 10993-5:2009. Evaluación biológica de productos sanitarios — Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro** [Norma técnica]. https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0044389

Organización Mundial de la Salud. (2023, 5 de abril). *Diabetes* [Nota descriptiva]. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes

Paola, T. P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes, 23*(4), 446–457. https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8

Patel, D. F., Peiró, T., Bruno, N., Vuononvirta, J., Akthar, S., Puttur, F., Pyle, C. J., Suveizdytė, K., Walker, S. A., Singanayagam, A., Carlin, L. M., Gregory, L. G., Lloyd, C. M., & Snelgrove, R. J. (2019). Neutrophils restrain allergic airway inflammation by limiting ILC2 function and monocyte–dendritic cell antigen presentation. Science Immunology, 4(41). https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax7006

Paul, W. E. (2021). *Fundamental immunology* (8th ed.). Wolters Kluwer.

Pérez Zapata, L. J., Trejos Ramírez, A. M., Arias Sierra, A. A., & López Quntero, J. Á. (2020). Formación de trampas extracelulares de neutrófilos humanos *In vitro*: descripción

de un método. Hechos Microbiológicos, 10(1–2). https://doi.org/10.17533/udea.hm.v10n1a01

Renda, G., Gökkaya, İ., & Şöhretoğlu, D. (2022). Immunomodulatory properties of triterpenes. *Phytochemistry Reviews, 21*(2), 537–563. https://doi.org/10.1007/s11101-021-09785-x

Riss, T. L., R. A. Moravec , A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, J. Worzella, L. Minor. (2016). Cell Viability Assays. En: Assay Guidance Manual (Eds. Sittampalam G. S., N. P. Coussens, Brimacombe K., et al.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda, pp. 357- 388.

Sas, C. (2015, 7 de septiembre). Panorama de la obesidad y el sobrepeso en Colombia. *Consultorsalud*. https://consultorsalud.com/panorama-de-la-obesidad-y-el-sobrepeso-en-colombia/

Sáez, V., Hernáez, E., & Sanz, L. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros, 5*(1), 23–45. https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/08/2004-virginia.pdf

Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology, 89*(2–3), 277–283. https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.007

Sociedad Botánica Ibérica. (2024). *Triterpenos: Estructura y función en plantas*. Plantas y Hongos. https://www.plantasyhongos.es/glosario/triterpenos.htm

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release, 70*(1–2), 1–20. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4

Universidad de Granada. (2004). *Terpenoides* [Recurso educativo]. Quiored. https://www.ugr.es/~quiored/pnatu/terpenoides.htm

Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, X., Li, Y., & Wang, Y. (2019). Triterpenes from *Eucalyptus* spp.: Isolation and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67*(12), 3215–3222. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06511

Zhu, C., Shi, S., Jiang, P., Huang, X., Zhao, J., Jin, Y., Shen, Y., Zhou, X., Liu, H., & Cai, J. (2023). Curcumin Alleviates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Neutrophil Extracellular Traps Formation. Journal of Investigative Surgery, 36(1). https://doi.org/10.1080/08941939.2022.2164813