

## Efecto inmunomodulador de la raíz de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltl. en artritis reumatoide

Yury Maritza Zapata Lopera<sup>1</sup>, Jesús Enrique Jiménez Ferrer<sup>2</sup>, Antonio Ruperto Jiménez Aparicio<sup>1</sup>, Alejandro Zamilpa Álvarez<sup>2</sup> y Manases González-Cortázar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN)

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Sur (CIBIS-IMSS)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por sinovitis, destrucción progresiva del cartílago articular y hueso subyacente y diversas manifestaciones extraarticulares. Especies del género *Bouvardia* han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones inflamatorias como la AR. El esquema de separación química incluyó una bipartición, de la que se obtuvieron una fracción acuosa, una de acetato de etilo; de un fraccionamiento posterior se obtuvieron las reuiones R1, R2, R3, R4 y las fracciones Fr38, Fr29, Fr19, Fr10. Estas fracciones se caracterizaron químicamente y se estableció la composición química, identificando los productos del metabolismo secundario pertenecientes al grupo de los flavonoides, saponinas, terpenos, cumarinas y ciclo-péptidos a los que se les ha atribuido actividad antiinflamatoria. La caracterización farmacológica resultó de la determinación de la concentración de citocinas en articulaciones sinoviales con el modelo de artritis inducido con CFA y colágeno tipo II. Se mostró una disminución significativa de la concentración de IL-17 que, respecto al grupo control negativo, con la interfase acuosa en un 64%, con la interfase orgánica de acetato de etilo 65%, y con R3 70.3%. Respecto a la IL-1 $\beta$  solo la fracción acuosa y R4 disminuyeron en 10.2% y 15.7% respectivamente. La concentración IL-6 disminuyó la concentración con las reuiones R1, R2, R3 y R4 42%, 48%, 37% y 64% en el mismo orden. El TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente con la reunión R4 en un 60.9%. Respecto a la citocina antiinflamatoria IL-10 se observó un incremento de entre el 94 y 99% con los tratamientos con las reuiones R1, R2, R3, R4. En los riñones se observó respecto a la IL-17

Autora para correspondencia: yzapatal1600@alumno.ipn.mx

disminuciones significativas con los tratamientos de interfase acuosa, con la interfase orgánica de acetato de etilo, el tratamiento control positivo con metotrexato, R1, R2, R3 y R4 66%, 72%, 57%, 60.6%, 77.7%, 69.5% y 65.5% en ese orden. Considerando a la IL-1 $\beta$  se observaron disminuciones, comparando contra el grupo de daño, con los tratamientos de interfase acuosa, interfase de acetato de etilo reuniones R1y R2: 69.4%, 32.5%, 39% y 41.9% respectivamente. En tanto con IL-6 se mostró una disminución significativa comparando con el grupo control negativo, con el tratamiento con la interfase acuosa, R1, R2, R3 y R4: 68.9%, 85.8%, 88.5%, 81.6% y R4 82.2% respectivamente. Con TNF- $\alpha$  hubo disminuciones significativas respecto al grupo de daño, con la administración de interfase orgánica de acetato y acuosa, reuniones R1, R2 y R4 en: 42.8%, 70.9%, 40%, 34% y 80.2% en el mismo orden. Se observó el mismo comportamiento de la concentración de IL-10 tanto en riñones como en las articulaciones.

En el cultivo primario de células sinoviales obtenidas del modelo de AR inducido con CFA y colágeno tipo II, todas las fracciones y compuestos evaluados de la raíz de *Bouvardia ternifolia* disminuyeron significativamente la concentración de IL-1 $\beta$  respecto a lo cuantificado en el grupo de daño, y se observó una mayor eficacia de las fracciones Fr19 y Fr29 con un 75%y 83.6%; también provocó la disminución de la concentración de IL-6 con el tratamiento con la interfase acuosa, interfase orgánica de acetato de etilo, grupo control positivo con metotrexato, reuniones R1, R2, R3 y R4, fracciones Fr29, Fr19, Fr10 y el compuesto Fr38: 83%, 89.8%, 84.5%, 86.9%, 98.1%, 95.3%, 95.6%, 94.4%, 94.4, 88.6% y 94.4%, respectivamente. Respecto a TNF- $\alpha$  se observó una disminución significativa respecto al grupo de daño, con los tratamientos con la interfase orgánica de acetato de etilo y acuosa, reuniones R1, R2 y R4 en: 42.8%, 70.9%, 40%, 34% y 80.2%. En tanto con la IL-10, se expresó de manera significativa con respecto al control de daño, con cada uno de los tratamientos administrados.

En la evaluación de la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 por medio del cultivo de macrófagos RAW-Blue inducidos con LPS, los tratamientos que fueron capaces de disminuir la

expresión de dichos genes fueron: la interfase orgánica, las reuniones R1, R2, R3 y R4, las fracciones Fr19, Fr29, Fr 38 y el compuesto aislado e identificado como escopoletina con porcentajes de disminución de: 91%, 86%, 93.5%, 85.8%, 90.7%, 75.6%, 19%, 88% y 34%. Mientras que la interfase acuosa y la fracción Fr10 aumentan el nivel de expresión de NF- $\kappa$ B. Se logró identificar a 4 compuestos que se aislaron de las fracciones Fr19 que corresponde a un compuesto que no ha sido reportado para *Bouvardia ternifolia* y el cual se denominó ternifoliol, Fr29, Fr38 el cual se determinó que corresponde a bouvardín y también se identificó a la escopoletina.

## DESTACANDO LOS RESULTADOS DE UNO DE LOS MODELOS UTILIZADOS EN CELULAS RAW-BLUE

### **Modelo de inflamación con lipopolisacárido (LPS) en macrófagos**

La inflamación iniciada por la invasión de patógenos o lesión celular es una respuesta fisiológica normal e inmune. La respuesta inflamatoria normal implica la activación de varios componentes celulares diferentes, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos. En condiciones de estimulación inmune, los macrófagos desempeñan un papel central y contrarrestan los estímulos que incluyen lipopolisacáridos (LPS). El LPS derivado de la membrana externa de bacterias Gram negativas activa los macrófagos para sobre-expresar mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO), prostaglandina PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-6 son esenciales para la supervivencia del huésped y la reparación de la lesión tisular. Entre ellos, el NO sintetizado a partir de la NO sintasa inducible (iNOS) regula la expresión de mediadores proinflamatorios, y el TNF- $\alpha$  y la IL-6 son conocidos como importantes mediadores implicados en el proceso de diversas enfermedades inflamatorias (Ma et al., 2014).

El NF- $\kappa$  $\beta$  y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) son vías de señalización inflamatorias típicas en los macrófagos. NF- $\kappa$  $\beta$  compuesto por la subunidad p65/p50, es un factor de transcripción que modula la expresión de genes asociados a la

producción de citocinas inflamatorias. En células normales, p65 de NF- $\kappa$ B es secuestrado por I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma. Tras la activación por diversos estímulos inflamatorios, incluido LPS, la ruta de la I $\kappa$ B cinasa se activa para fosforilar I $\kappa$ B $\alpha$ . El I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado se disocia del complejo p65 / I $\kappa$ B $\alpha$  y el NF- $\kappa$ B libre se transloca al núcleo. El NF- $\kappa$ B translocado en el núcleo se une al promotor y regula la expresión de estos genes mediadores inflamatorios, incluidos iNOS, ciclooxigenasa COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-6. En este punto, muchas drogas para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias se centran en suprimir la activación de NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2011).

### **Metodología utilizada para el modelo de inflamación mediada por NF- $\kappa$ B en macrófagos RAW-Blue™**

Se llevó a cabo la evaluación de 6 fracciones y 4 compuestos con potencial efecto anti-artrítico, en un modelo *in vitro* usando macrófagos murinos RAW-Blue, lo cuales poseen un gen reportero inducible por NF- $\kappa$ B y AP-1; específicamente, tiene insertado en su genoma de manera estable el cDNA que codifica para una fosfatasa alcalina embrionaria secretable. Los niveles de la fosfatasa alcalina se miden en el medio de cultivo por colorimetría, para lo que se colectan 50  $\mu$ l de medio, que son mezclados con 150  $\mu$ l del reactivo QUANTI-Blue (InvivoGen).

El ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor de la línea celular (InvivoGen, USA. Código de catálogo: Raw-Sp). Se sembraron 100,000 células (con 200  $\mu$ l de medio DMEM con 100  $\mu$ g/ml de normocin™ y zeocina™ antibiótico selectivo) por pozo en placas de 24 pozos, donde se les agregó dos concentraciones de los tratamientos derivados de *B. ternifolia* (50 y 25  $\mu$ g/ml) y un estímulo pro-inflamatorio de LPS (1 $\mu$ g/ml). Las células fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y posteriormente se colectaron 50  $\mu$ l del medio en el que se encontraban, a partir de éste se midió mediante un ensayo colorimétrico (QUANTI-Blue -InvivoGen) la cantidad de fosfatasa alcalina secretada, indicador de la actividad de NF- $\kappa$ B y AP-1, factores de transcripción importantes en procesos inflamatorios como la artritis reumatoide.

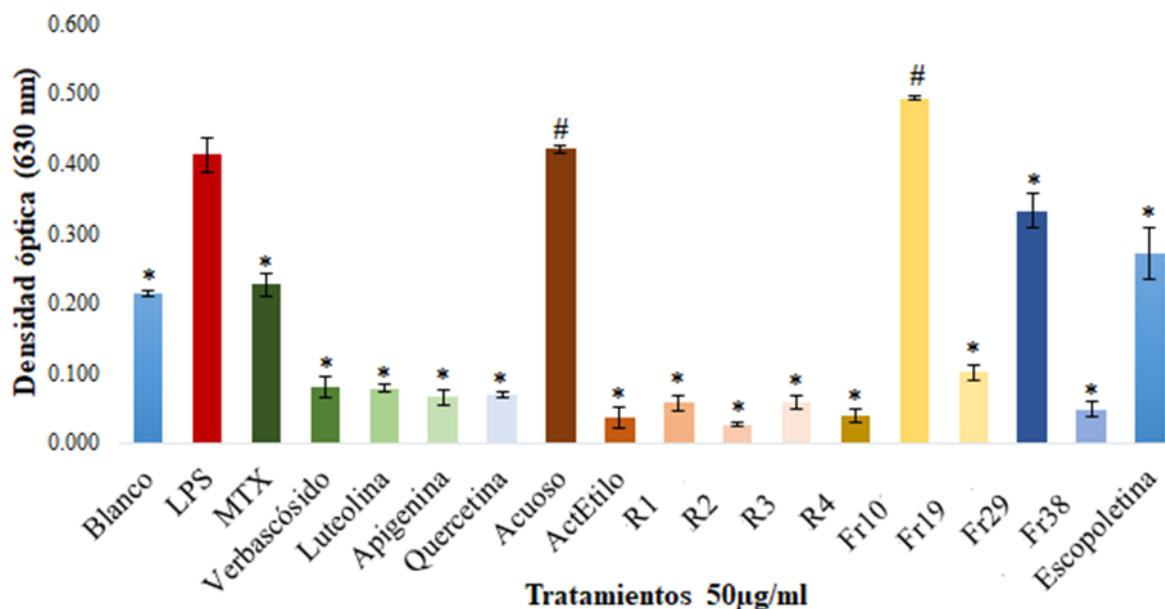
**Tabla 1.** Tratamientos y dosis utilizadas en el modelo RAW-BLUE.

Grupo	Tratamiento vía oral	Dosis
Control basal	Agua+ tween	100 µl/10g
Control daño	Agua+ tween+LPS	100 µl/10g + 1µg/ml
Controles positivos	Metotrexato	50 µg/ml
	Verbascósido	
	Luteolina	
	Apigenina	
	Quercetina	
Experimentales	Fracción acuosa	
	Fracción acetato de etilo	
	Fracción R1	
	Fracción R2	
	Fracción R3	
	Fracción R4	
	Fracción 10	
	Fracción 19	
	Fracción 29	
Fracción 38		

## Resultados del modelo en macrófagos

El modelo de macrófagos RAW-Blue que se utilizó permite conocer el nivel de expresión de NF-κB, pues se utiliza una línea celular que tiene un gen reportero que sintetiza fosfatasa alcalina, lo que permite cuantificar el nivel de expresión-activación de NF-κB y por consecuencia los productos que controlan, como citocinas, utilizando una reacción que puede ser medida por la actividad de la enzima liberada al medio y, de esta forma, evaluar la capacidad de las fracciones y compuestos de *B. ternifolia* para modular la inflamación dependiente de la actividad del NF-κB. Se observó que el estímulo con LPS (grupo control negativo o de daño) duplica el nivel expresión de NF-κB al compararlo con el grupo sano (control basal). Cuando se utilizó MTX (control positivo), se provocó una disminución significativa de la expresión del NF-κB, alcanzado la expresión basal. En este ensayo se utilizaron como control positivo compuestos de los que se tiene evidencia de su capacidad de inhibir la expresión de NF-κB, como: feniletanoides (verbascosido) y flavonoides (luteolina, apigenina y quercetina) y la

expresión del NF- $\kappa$ B, disminuyó de manera muy importante, inclusive por debajo de lo expresado con las células sin estímulo (blanco), con valores de inhibición del orden de entre 77.5% a 87.5%. Notablemente, el tratamiento con el extracto orgánico de la interfase de acetato de etilo presentó un 91% de inhibición y las reuniones del fraccionamiento cromatográfico del extracto AcOEt R1 (86%), R2 (93.5%), R3 (85.8%), R4 (90.7%). Los compuestos presentes en las fracciones: Fr19 (75.6%), Fr29 (19%), Fr38 (88%) y escopoletina (34%) suprimieron la activación de NF- $\kappa$ B en forma dependiente de la concentración, mientras que la fracción acuosa y el compuesto Fr10 aumentan la actividad de NF- $\kappa$ B (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto inmunomodulador de las fracciones y compuestos de *B. ternifolia* sobre NF- $\kappa$ B en macrófagos RAW-Blue. A) Inhibición de NF $\kappa$ B en macrófagos RAW-Blue (50 $\mu$ g/ml). Vehículo (Blanco): tween 20. ANOVA de una vía con post-prueba de Dunnet ( $p = \acute{o} < 0.05$ ) ( $n=3$ ). Significancia respecto a LPS + Veh. B) Células con LPS más metotrexato; verbáscosido, luteolina, apigenina, quercetina (ctrls). C) Células con LPS con tratamiento a 50 $\mu$ g/ml. Basal (Blanco, células sin ningún tratamiento con vehículo). \* Inhibición de NF- $\kappa$ B; # Aumento de NF- $\kappa$ B.

El NF- $\kappa$ B es un factor principal que regula la expresión de enzimas y citocinas inducidas por la inflamación, como iNOS, COX-<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-6, que incluyen los sitios de unión de NF- $\kappa$ B en sus promotores, y ha atraído atención como un nuevo objetivo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la regulación adecuada de NF- $\kappa$ B puede ser beneficiosa en el tratamiento de muchos trastornos inflamatorios. Recientemente, Jung *et al.* informaron que la raíz de *Panax notoginseng* (PN) inhibió los mediadores inflamatorios inducidos por LPS, incluidos iNOS y COX-<sub>2</sub> mediante el bloqueo de la degradación de I $\kappa$ B en el citosol y la translocación nuclear de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B. Choi *et al.* demostraron que la nobiletin aislada de la cáscara de la fruta de *Citrus sunki* inhibe la expresión de los genes implicados en la inflamación bloqueando la actividad de unión del NF- $\kappa$ B al DNA, por lo que se sugiere que las fracciones y compuestos obtenidos de la raíz de *Bouvardia ternifolia* están bloqueando la fosforilación de I $\kappa$ B e impidiendo la traslocación al núcleo de la subunidad del NF- $\kappa$ B en células RAW-Blue estimuladas con LPS y por tanto su efecto antiinflamatorio (Kim *et al.*, 2011).

La patogénesis de la AR involucra una variedad de tipos de células, incluyendo células inmunitarias innatas como monocitos / macrófagos, células T, células B y fibroblastos sinoviales. El NF- $\kappa$ B media la inducción de citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, en monocitos / macrófagos. Muchas de estas citocinas son capaces de activar NF- $\kappa$ B en células inmunitarias innatas y fibroblastos, induciendo así la expresión de citocinas inflamatorias y quimiocinas adicionales, lo que lleva a un mayor reclutamiento de células inmunitarias inflamatorias y diseminación de la inflamación. Entre los diferentes subconjuntos de células T, las células Th17 son particularmente importantes para la patogénesis de AR. Como se describió anteriormente, NF- $\kappa$ B promueve la diferenciación Th17 tanto indirectamente a través de la inducción de citocinas inflamatorias, IL-1, IL-6 e IL-23, en células inmunitarias innatas y regula directamente los factores de transcripción del linaje Th17 en células T. La activación desregulada de NF- $\kappa$ B también contribuye a la supervivencia aberrante de las células B autorreactivas y la producción de autoanticuerpos que contribuyen a la patogénesis de la AR. En

particular, los pacientes con AR a menudo muestran niveles séricos elevados de factor de activación de células B pertenecientes a la familia de TNF asociados con la activación desregulada del NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B media la patogénesis de la AR al funcionar en diferentes tipos de células (Liu et al., 2017).

Dado que la activación desregulada de NF- $\kappa$ B está implicada en diversas enfermedades inflamatorias, el objetivo de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B representa un enfoque atractivo para las terapias antiinflamatorias. Se han desarrollado varias categorías de inhibidores para bloquear diferentes etapas de la señalización de NF- $\kappa$ B (1) y se ha diseñado un número creciente de inhibidores selectivos de IKK para bloquear su actividad catalítica y evitar la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ .

Algunos medicamentos antiinflamatorios conocidos, como la aspirina y el salicilato también tienen la capacidad de inhibir IKK (2); inhibidores de la proteasoma, como Velcade (también llamado Bortezomib y PS-341) y lactacistin, bloquean la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el proteasoma (3); inhibidores tales como tacrolimus (FK-506) y super-represor I $\kappa$ B $\alpha$  bloquean la translocación nuclear de diferentes subunidades del NF- $\kappa$ B (4); fármacos como glucocorticoides y agonistas de receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) inhiben la actividad de unión del NF- $\kappa$ B a ADN. Sin embargo, aunque se han realizado progresos significativos en el diseño de enfoques para inhibir NF- $\kappa$ B, existen complejidades para el desarrollo de fármacos basados en NF- $\kappa$ B clínicamente disponibles. Aunque la inhibición de NF- $\kappa$ B podría ser beneficiosa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, existen preguntas obvias sobre el equilibrio entre eficacia y seguridad, ya que también se requiere la función NF- $\kappa$ B para mantener respuestas inmunes normales y la supervivencia celular. Los estudios de acumulación sugieren que la inhibición global de la señalización de NF- $\kappa$ B puede causar efectos secundarios graves (Liu et al., 2017; Tak & Firestein, 2001).

Por lo tanto, una mejor comprensión del mecanismo subyacente a la activación patológica de NF- $\kappa$ B en enfermedades individuales es crucial para diseñar agentes

terapéuticos más específicos y efectivos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las vías canónicas y no canónicas de NF- $\kappa$ B también median la diferenciación inducida por RANK ligando de monocitos / macrófagos en los osteoclastos que resorben los huesos, cuya desregulación contribuye a la pérdida ósea inflamatoria asociada con AR. El compuesto Fr38 que posiblemente corresponde a Bouvardin tiene un efecto en la síntesis de proteínas y adicionalmente sobre la proliferación celular; es un compuesto que puede inducir apoptosis, por lo que puede estar modulando la expresión de NF-  $\kappa$ B (Stickel et al., 2015).

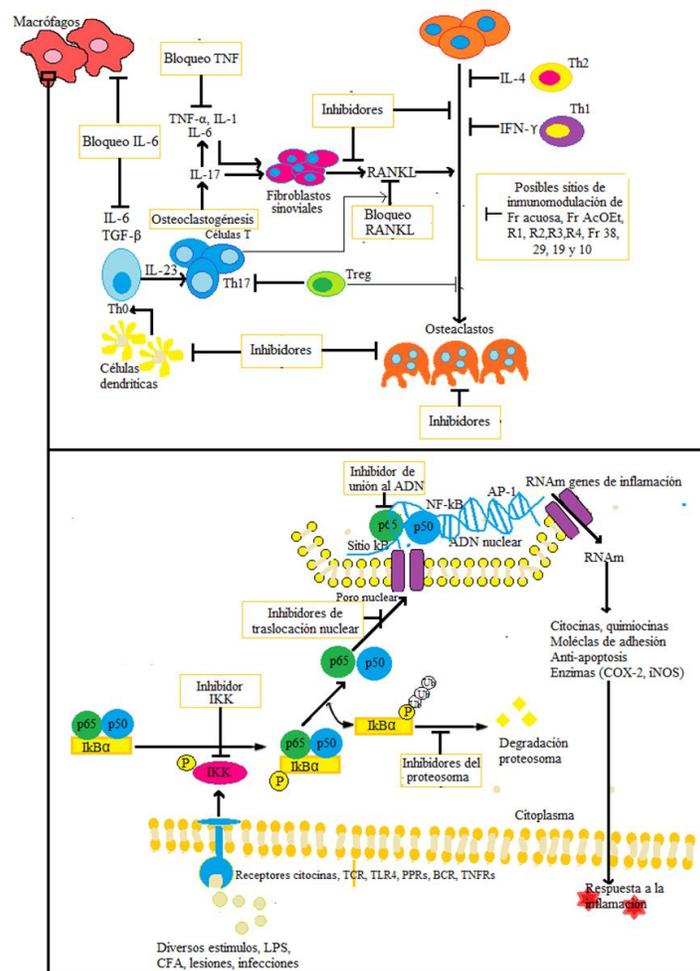


Figura 2. Mecanismos de acción propuestos para el efecto inmunomodulador de las fracciones y compuestos obtenidos de *Bouvardia ternifolia* sobre citocinas y el factor nuclear  $\kappa$ B en articulaciones sinoviales y células.

## Referencias bibliograficas

- Kim, G. S., Kang, S. R., Han, D. Y., Park, K. Il, Park, H. S., Cho, Y. B., Lee, H. J., Lee, W. S., Ryu, C. H., Ha, Y. L., Lee, D. H., & Kim, J. A. (2011). Suppressive effect on lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators by *Citrus aurantium* L. in macrophage RAW 264.7 cells via NF- $\kappa$ B signal pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(January). <https://doi.org/10.1155/2011/248592>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(March), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Ma, J., Oh, Y.-C., Jeong, Y., Kim, T., & Cho, W.-K. (2014). Anti-inflammatory effect of *Artemisiae annuae* herba in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cells. *Pharmacognosy Magazine*, 10(39), 588. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.139793>
- Stickel, S. A., Gomes, N. P., Frederick, B., Raben, D., & Su, T. T. (2015). Bouvardin is a radiation modulator with a novel mechanism of action. *Radiation Research*, 184(4), 392–403. <https://doi.org/10.1667/RR14068.1>
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7–11. <https://doi.org/10.1172/JCI11830.NF->