



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Evaluación del potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y en el modelo murino de edema por TPA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:**

**B. E. Sergio David García García**

**COMITÉ TUTORAL:**

Director.

**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.**

Asesor

**Dr. Abraham Giacoman Martínez**

Asesor

**Dra. Malinalli Brianza Padilla**

Ciudad de México

Noviembre, 2022

## Declaración de originalidad

El que suscribe Sergio David García García, alumno del posgrado Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Evaluación del potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y en el modelo murino de edema por TPA".

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el Comité del Posgrado de Biología Experimental para lo obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 17 de Noviembre del 2022.

Atentamente



---

Sergio David García García

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de Noviembre de 2022

Comisión Académica del Posgrado

Biología Experimental

Presente

El que suscribe Sergio David García García, alumno con número de matrícula 2202800568, del posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Evaluación del potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y en el modelo murino de edema por TPA” a desarrollar en Laboratorio de Farmacología lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



---

Sergio David García García

## MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada "Evaluación del potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y en el modelo murino de edema por TPA", con fecha de presentación para obtener el grado de maestría el día 17 de Noviembre de 2022.

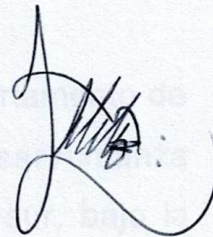
### Presidente

Dr. Abraham Giacoman Martínez

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS

Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa

[a.giacoman@xanum.uam.mx](mailto:a.giacoman@xanum.uam.mx)



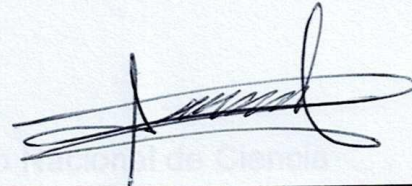
### Secretario

Dr. Rodrigo Romero Nava

Sección de Estudios de Posgrado e investigación

ESM-IPN

[roloromer@gmail.com](mailto:roloromer@gmail.com)



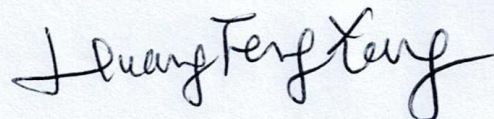
### Vocal 1

Dra. Fengyang Huang

Departamento de Farmacología y Toxicología

Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

[huangfengyang@gmail.com](mailto:huangfengyang@gmail.com)



### Vocal 2

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Departamento de Inmunología

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

[fausto22@yahoo.com](mailto:fausto22@yahoo.com)



El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada al alumno Sergio David García García con el Número de Becario 773093

CVU: 1080167

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Julio César Almanza Pérez, en el laboratorio de Farmacobiología del CINVESTAV sede sur, bajo la asesoría del Dr. Abraham Giacomán Martínez y en el Departamento de Inmunología en el Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez, bajo la asesoría de la Dra. Malinalli Brianza Padilla.

Este trabajo de investigación se realizó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; FORDECYT/PRONACES (Ciencia de Frontera 377882).

## Comité Tutorial

### **Director**

#### **Dr. Julio Cesar Almanza Pérez**

Profesor-Investigador

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS

Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa

[jcap@xanum.uam.mx](mailto:jcap@xanum.uam.mx)

### **Asesor**

#### **Dr. Abraham Giacamán Martínez**

Profesor-Investigador

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS

Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa

[a.giacoman@xanum.uam.mx](mailto:a.giacoman@xanum.uam.mx)

### **Asesora**

#### **Dra. Malinalli Brianza Padilla**

Investigadora en Ciencias Médicas "C".

Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología

Ignacio Chávez

[malinalli.brianza@cardiologia.org.mx](mailto:malinalli.brianza@cardiologia.org.mx)

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres: Ricardo y Catalina**

Muchísimas gracias por todo el apoyo que me han brindado, gracias por las enseñanzas de vida hasta ahora, por amarme tanto y apoyarme en todo lo que he decidido hacer.

Porque solo la superación de mis ideales, me han permitido comprender cada día más la difícil posición de ser padres, mis conceptos, mis valores morales y mi superación se las debo a ustedes; esto será la mejor de las herencias; lo reconozco y lo agradeceré eternamente. Estoy muy contento con lo que aprendí, con lo que sé y con lo que represento, en adelante, pondré en práctica mis conocimientos y el lugar que en mi mente ocuparon los libros, ahora será de ustedes, esto, por todo el tiempo que les robe pensando en mí.

### **A mis hermanos: Luis Alberto y Rubén**

Por su apoyo incondicional, por sus pláticas, consejos y abrazos. Por creer en mí y por alentarme a superarme y ser mejor persona cada vez más. Con amor y cariño, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Julio Cesar Almanza Pérez** por su amistad, por sus consejos, por ser mi profesor, amigo y mentor. Por su paciencia y guía desde la licenciatura, ahora, en esta última fase, compartirme un poco de su experiencia de vida al ayudarme a tomar las mejores decisiones, o al menos, las que creo son mejores, favorables y convenientes en mi camino. Por los buenos momentos vividos, por chistes y risas.

Al **Dr. Abraham Giacamán Martínez** por sus consejos, platicas motivacionales, por todas sus enseñanzas de biología molecular, por brindarme la estancia en el Hospital Infantil, por comprenderme en cada platica de miedos e inquietudes, por su amistad y confianza. Por los buenos momentos vividos, por chistes y risas.

A la **Dra. Malinalli Brianza Padilla** por sus enseñanzas de biología molecular e inmunología, por su amistad, por brindarme la oportunidad de realizar la estancia en el Instituto Nacional de Cardiología, por su apoyo, consejos y observaciones para ser mejor académica y personalmente.

A mis **compañeros del hospital infantil “Federico Gómez”**, por enseñarme y permitirles enseñar los conocimientos que hemos adquirido; Pao, Mara y Elihu.

A mis **compañeros del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**, por hacer la materia de inmunología muy interdisciplinaria, disfrute de su compañía en las clases; Kelly y Adriana.

Y aunque este trabajo sea la culminación de la Maestría, también quiero agradecer el apoyo que recibí en la Licenciatura por parte del Dr. Iván Jasso Villagómez y en ese entonces, mi compañera, Susana Aguilar Ramírez. Gracias.

Por último, pero no menos importante, a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, mi más grande y bonita casa de estudios, gracias por tanto, gracias por mucho, gracias por TODO.



## **ABREVIATURAS**

**AA:** Ácido araquidónico

**ARG1:** Arginasa 1

**AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**COX-1:** Ciclooxygenasa tipo 1

**COX-2:** Ciclooxygenasa tipo 2

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**IFN- $\gamma$ :** Interferón Gamma

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-13:** Interleucina 13

**IL-23:** Interleucina 23

**IP3:** Inositol trifosfato

**iNOS:** Óxido nítrico inducible

**I $\kappa$ B:** Cinasa inhibidora de I $\kappa$ B

**LBP:** Proteína de unión al LPS

**LOX:** Lipooxygenasa

**LPS:** Lipopolisacárido

**LT:** Leucotrienos

**LTB4:** Leucotrieno B4

**LX:** Lipoxinas

**MCP-1:** Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1

**MIP-1 $\beta$ :** Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$

**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz

**MPO:** Mieloperoxidasa

**MTT:** Metiltiazoltetrazolio

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Especies Reactivas de Nitrógeno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAMP:** Patrón molecular asociado a patógenos

**PPAR $\alpha$ :** Receptores activados por el proliferador de peroxisomas  $\alpha$

**PPAR $\beta/\delta$ :** Receptores activados por el proliferador de peroxisomas  $\beta/\delta$

**PPAR $\gamma$ :** Receptores activados por el proliferador de peroxisomas  $\gamma$

**PRR:** Receptor de reconociendo de patrones

**PBS:** Buffer Fosfato Salino

**PG:** Prostaglandinas

**PGE2:** Prostaglandina E2

**PGI2:** Prostaglandina I2

**PKC:** Proteína cinasa C

**PLA2:** Fosfolipasa citosólica A2

**PMN:** Polimorfonucleares

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**RT-PCR:** Transcripción en Reversa acoplado a Reacción en Cadena de la Polimerasa

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TLR:** Receptor tipo toll

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TPA:** 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

**TX:** Tromboxanos

**TZD:** Tiazolidinediona

**VCAM:** Moléculas de Adhesión Intercelular Vascolar

## RESUMEN

### Introducción

La inflamación es un proceso fisiológico protector que se activa en respuesta a una agresión físico-química para el restablecimiento del tejido afectado. En la inflamación, los macrófagos juegan un papel crítico mediante la producción de citocinas. Una respuesta inflamatoria excesiva y prolongada puede conducir a enfermedades asociadas al síndrome metabólico, cardiovasculares, respiratorias, digestivas o autoinmunes. En el mercado existen medicamentos antiinflamatorios que causan efectos adversos cuando se consumen por periodos prolongados. Lo anterior justifica la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios. En la medicina tradicional mexicana existe una gran diversidad de especies vegetales con diferentes usos antiinflamatorios. *Hibiscus sabdariffa*, conocida popularmente como jamaica o flor de hibisco, se utiliza como agente anti-obesidad y para el tratamiento de la diabetes. Entre los principales compuestos identificados en *H. sabdariffa* se encuentran  $\alpha$ -amirina y lupeol (reportados como agonistas a PPAR $\delta/\gamma$ ), los cuales pueden estar relacionados con efectos antiinflamatorios, sin embargo, no se ha profundizado al respecto. Con la finalidad de esclarecer el mecanismo de acción de estos compuestos, el presente trabajo evalúa estas moléculas triterpenoides en un modelo *in vivo* inflamatorio agudo de TPA, en un modelo *in vitro* de macrófagos y en estudios *in silico* de acoplamiento molecular.

### Objetivo

Evaluar el efecto y actividad antiinflamatorios de  $\alpha$ -amirina y lupeol en modelos *in vivo*, *in vitro* y estudios *in silico*.

### Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en un modelo de inflamación aguda *in vivo* (TPA).
2. Caracterizar la expresión de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) en cultivo de macrófagos tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol.

3. Determinar las concentraciones de citocinas (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) en sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol.
4. Evaluar la interacción de  $\alpha$ -amirina y lupeol con la COX-2 mediante análisis de acoplamiento molecular.

## **Materiales y métodos**

### **Modelo *in vivo***

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 normales, a los que se les indujo inflamación tópica mediante la administración de TPA (acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol) (2.5  $\mu$ g) en la oreja; posteriormente se administraron los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol (1 mg/oreja), utilizando como control positivo indometacina (1 mg/oreja).

### **Modelo *in vitro***

Se cultivaron macrófagos de la línea celular RAW 264.7, los cuales fueron estimulados con LPS (5  $\mu$ g/mL) para inducir una respuesta inflamatoria; posteriormente se trataron con los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol (10  $\mu$ M), utilizando como control positivo celecoxib (10  $\mu$ M). Al final de los tratamientos la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 se cuantificó por qPCR, y las concentraciones de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1 en el medio de cultivo se determinaron por la técnica de ELISA.

### **Modelo *in silico***

Se realizó el acoplamiento molecular con la versión 4.2.6 del programa AutoDock utilizando el código de proteína 5JW1 del Protein Data Bank (PDB), resolución 2.81 Å para COX2. Mediante el programa computacional UCSF Chimera, la proteína 5JW1 fue minimizada, se le agregaron las cargas y retiraron las moléculas de agua.  $\alpha$ -amirina y lupeol se construyeron mediante el programa Chembiodraw y se minimizaron (MMFF94) con el programa auxiliar Chem3D. A continuación, se llevó a cabo el docking molecular mediante el programa Autodock. Los cálculos de acoplamiento se realizaron con AutoDock versión 4.2.6, que realiza un acoplamiento automatizado de los ligandos con flexibilidad diédrica especificada por

el usuario dentro de un sitio de unión rígida de proteínas. El programa realizó varias ejecuciones (100) en cada experimento de acoplamiento. Cada ejecución proporcionó una posición predicha en el modo de acoplamiento en el sitio alostérico de inhibición de COX-2.

## **Resultados**

Los resultados mostraron en el modelo de TPA que ambos compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol inhibieron significativamente el desarrollo del edema auricular, en un 68% con respecto al grupo control; y un 55% respecto al grupo tratado con indometacina.

En macrófagos RAW 264.7 los compuestos disminuyeron significativamente en un 37.5% la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , así como la concentración de MCP-1 en el cultivo con respecto al grupo de LPS. Por otra parte, los compuestos aumentaron significativamente en un 50% la expresión y concentración de IL-10 con respecto al grupo de LPS.

Las imágenes 3D y 2D del acoplamiento molecular del celecoxib (inhibidor específico de COX-2), lupeol y  $\alpha$ -amirina en el sitio alostérico de COX2 revelan que se unen con una  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol (100/100 conformaciones),  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol (43/100 conformaciones) y  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol (21/100 conformaciones) respectivamente.

## **Conclusión**

La administración de  $\alpha$ -amirina y lupeol disminuyen significativamente el desarrollo del edema provocado por TPA. El efecto antiinflamatorio que ejercen ambos compuestos puede estar asociado a un descenso general de citocinas proinflamatorias y un aumento de citocinas antiinflamatorias. Además, el mecanismo de acción farmacológica puede asociarse con una interacción química con la COX-2.  $\alpha$ -amirina y lupeol representan una alternativa importante de moléculas multi blanco, ya que además de ser agonistas duales de PPARs ejercen un efecto antiinflamatorio, lo cual representa una ventaja terapéutica para enfermedades metabólicas con carácter inflamatorio.

## **ABSTRACT**

### **INTRODUCTION**

Inflammation is a protective physiological process that is activated in response to a physical-chemical aggression for the restoration of the affected tissue. In inflammation, macrophages play a critical role by producing cytokines. An excessive and prolonged inflammatory response can lead to diseases associated with metabolic, cardiovascular, respiratory, digestive, or autoimmune syndrome. In the market there are anti-inflammatory drugs that cause adverse effects when consumed for prolonged periods. This justifies the search for new anti-inflammatory compounds. In traditional Mexican medicine there is a great diversity of plant species with different anti-inflammatory uses. Hibiscus sabdariffa, popularly known as hibiscus or hibiscus flower, is used as an anti-obesity agent and for the treatment of diabetes. Among the main compounds identified in H. sabdariffa are  $\alpha$ -amyrin and lupeol (reported to PPAR $\delta/\gamma$  agonists), which may be related to anti-inflammatory effects, however, this has not been deepened. To clarify the mechanism of action of these compounds, the present work evaluates these triterpenoid molecules in an acute inflammatory *in vivo* model of TPA, in an *in vitro* model of macrophages and *in silico* studies of molecular coupling.

### **Objective**

To assess the effect and anti-inflammatory activity of  $\alpha$ -amyrin and lupeol *in vivo*, *in vitro* and *in silico* studies.

### **Objectives**

1. To assess the anti-inflammatory effect of  $\alpha$ -amyrin and lupeol in an *in vivo* acute inflammation (APR) model.
2. Characterize the expression of cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) in culture of macrophages treated with  $\alpha$ -amyrin and lupeol.

3. To determine cytokine concentrations (IL-6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-10) in RAW 264.7 macrophage supernatants treated with  $\alpha$ -amyrin and lupeol.
4. To evaluate the interaction of  $\alpha$ -amyrin and lupeol with COX-2 by molecular coupling analysis.

## **Materials and methods**

### ***In vivo* model**

Male mice of the normal CD-1 strain were used, which were induced topical inflammation by administering TPA (12-O-tetradecanoyl-phobol acetate) (2.5  $\mu$ g) in the ear; Subsequently, the compounds  $\alpha$ -amyrin and lupeol (1 mg/ear) were administered using indomethacin (1 mg/ear) as a positive control.

### ***In vitro* model**

Macrophages from the RAW 264.7 cell line were cultured and stimulated with LPS (5  $\mu$ g/mL) to induce an inflammatory response; subsequently treated with the compounds  $\alpha$ -amyrin and lupeol (10  $\mu$ M), using celecoxib (10  $\mu$ M) as a positive control. At the end of the treatments the expression of mRNA of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-10 was quantified by qPCR, and the concentrations of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and MCP-1 in the culture medium were determined by the ELISA technique.

### ***In silico* model**

Coupling was performed with version 4.2.6 of the AutoDock program using the protein code 5JW1 from the Protein Data Bank, resolution 2.81 Å for COX2. Using the UCSF Chimera computer program, the 5JW1 protein was minimized, the charges were added to it and the water molecules were removed.  $\alpha$ -amyrin and lupeol were constructed using the Chembiodraw program and minimized (MMFF94) with the Chem3D auxiliary program. Next, molecular docking was carried out using the Autodock program. Coupling calculations were performed with AutoDock version 4.2.6, which performs automated coupling of ligands with user-specified dihedral flexibility within a rigid protein binding site. The program performed several runs

(100) on each docking experiment. Each execution provided a predicted position in the coupling mode at the allosteric COX2 inhibition site.

## Results

The results showed in the TPA model that both compounds  $\alpha$ -amyrin and lupeol significantly inhibited the development of atrial edema, by 68% compared to the control group; and 55% compared to the group treated with indomethacin.

In RAW 264.7 macrophages the compounds significantly decreased by 37.5% the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , as well as the concentration in an MCP-1 in the culture with respect to the LPS group. On the other hand, the compounds significantly increased by 50% the expression and concentration of IL-10 with respect to the LPS group.

3D and 2D images of the molecular coupling of celecoxib (specific COX2 inhibitor), lupeol and  $\alpha$ -amyrin at the allosteric site of COX-2 reveal that they bind with a  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol (100/100 conformations),  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol (43/100 conformations) and  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol (21/100 conformations) respectively.

## Conclusion

Administration of  $\alpha$ -amyrin and lupeol significantly decrease the development of edema caused by TPA. The anti-inflammatory effect exerted by both compounds may be associated with a general decrease in proinflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory cytokines. In addition, the mechanism of pharmacological action may be associated with a chemical interaction with COX-2.  $\alpha$ -amyrin and lupeol represent an important alternative of multi-target molecules, since in addition to being dual agonists of PPARs they exert an anti-inflammatory effect, which represents a therapeutic advantage for metabolic diseases with inflammatory character.



## INDICE

1	INTRODUCCION.....	19
1.1	Sistema inmunológico.....	19
1.1.1	Monocitos y macrófagos.....	20
1.1.2	Activación del macrófago.....	21
1.2	Proceso inflamatorio.....	22
1.2.1	Fisiopatología de la inflamación.....	23
1.2.2	Reacción inflamatoria.....	23
1.2.3	Mediadores inflamatorios.....	26
1.3	Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	29
1.3.1	Edema de oído inducido por TPA <i>in vivo</i> .....	29
1.3.2	Modelo de estimulación de macrófagos con LPS <i>in vitro</i> .....	30
1.4	Tratamientos farmacológicos para la inflamación.....	31
1.5	El LPS como factor del proceso inflamatorio por la vía de NF- $\kappa$ B.....	32
1.5.1	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B).....	34
1.6	Inflamación del tejido adiposo.....	35
1.7	PPAR's e inflamación.....	37
1.8	Medicina tradicional usada en la inflamación.....	39
2	ANTECEDENTES.....	40
2.1	<i>Hibiscus Sabdariffa</i> .....	41
2.2	Lupeol.....	42
2.2.1	Lupeol e inflamación.....	43
2.3	$\alpha$ -amirina.....	44
2.3.1	$\alpha$ -amirina e inflamación.....	45
3	JUSTIFICACIÓN.....	46
4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	47
5	HIPÓTESIS.....	47
6	OBJETIVO GENERAL.....	48
7	OBJETIVOS PARTICULARES.....	48
8	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	49
8.1	Obtención de los compuestos.....	49
8.2	Modelo de evaluación antiinflamatoria <i>in vivo</i> .....	49

8.2.1 Animales experimentales.....	49
8.2.2 Edema auricular inducido con TPA.....	49
8.3 Modelo <i>in vitro</i> .....	50
8.3.1 Línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón <i>Mus musculus</i> .....	50
8.3.2 Viabilidad celular.....	51
8.3.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1).....	51
8.4 Análisis de la transcripción génica de citocinas inflamatorias.....	52
8.4.1 Extracción de ARN total.....	52
8.4.2 Cuantificación de la expresión del ARNm de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10.....	52
8.4.3 Docking molecular.....	53
9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
10 RESULTADOS.....	55
10.1 Evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	55
10.1.2 Efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular.....	55
10.1.3 Prueba de funcionalidad celular en las células RAW 264.7.....	56
10.1.4 Expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- $\beta$ e IL-10.....	57
10.1.5 Secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1.....	61
10.1.6 Acoplamiento molecular.....	66
11 DISCUSION.....	73
12 CONCLUSIONES.....	82
13 PERSPECTIVAS.....	83
14 REFERENCIAS.....	84

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 Sistema inmunológico.

El sistema inmunológico es una red interactiva de procesos biológicos compuesto por órganos linfoides, células inmunes y factores humorales como las citocinas, mismos que permiten mantener la homeostasis frente a agresiones internas y externas; reconociendo lo dañino y reaccionando frente a ello (Andersen et al., 2016).

La respuesta inmune se divide en dos: Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata incluye las barreras físicas y químicas, abarca elementos celulares y humorales (como el sistema de complemento, citocinas y proteínas de fase aguda), elementos que proporcionan una defensa inmediata (Nicholson, 2016).

La inmunidad adaptativa consiste en reacciones específicas de antígeno a través de la activación de linfocitos T y B.

Mientras que la respuesta innata es rápida y poco específica, la respuesta adaptativa es precisa y tarda varios días o semanas en desarrollarse (Parkin & Cohen, 2001). La memoria inmunológica es una adaptación evolutiva vital que confieren una protección duradera contra una amplia gama de patógenos. La memoria adaptativa es establecida por la memoria de los linfocitos T y B tras el reconocimiento de un antígeno, mientras que la memoria inmune innata, tiene lugar en células innatas como macrófagos y células asesinas naturales a través de la reprogramación epigenética y metabólica (Bulut et al., 2021).

Las células sanguíneas se generan a través de un proceso denominado hematopoyesis, donde a partir de la célula madre hematopoyética surgen células precursoras de plaquetas, eritrocitos y leucocitos, éstos últimos conforman las células del sistema inmunológico. Una vez que las células son generadas, salen de la médula ósea y se van a circulación o permanecen en otros órganos para terminar de madurar.

La hematopoyesis ocurre de manera continua para mantener un número adecuado de células e incrementa cuando existe un proceso inflamatorio (Kawamoto & Minato, 2004). De la célula madre hematopoyética se diferencian las células del progenitor mieloide, surgiendo así las células de la inmunidad innata, como los mastocitos, granulocitos (basófilo, eosinófilo y neutrófilo), células dendríticas y monocitos (Bernareggi et al., 2019). El presente trabajo se enfocará principalmente en la respuesta innata, particularmente en monocitos y macrófagos.

### 1.1.1 Monocitos y macrófagos.

Los monocitos son células efectoras inmunes de gran importancia (Abdulkhaleq et al., 2018), se encuentran disponibles en prácticamente todos los tejidos, su función es la de proteger contra infecciones, ayudar a otros leucocitos a eliminar tejidos dañados, destruir células cancerosas, regular la inmunidad y favorecer la activación y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Lacy, 2015). Los monocitos son células que circulan en la sangre, la médula ósea y el bazo; constituyen aproximadamente 10% del total de leucocitos en humanos. Sus características morfológicas típicas, son una forma irregular, núcleo ovalado, vesículas citoplasmáticas y alta proporción de citoplasma a núcleo. Los monocitos pueden permanecer en la circulación de 1 a 2 días, después de lo cual, si no han sido reclutados en un tejido, mueren y se eliminan. Los monocitos se reclutan en el tejido para convertirse en macrófagos residentes de tejido en condiciones homeostáticas, y macrófagos activados por inflamación durante una infección (Serbina et al., 2008).

La diferenciación de monocitos a macrófagos se asocia con la activación de genes del ciclo celular y de la modulación de los genes involucrados en el metabolismo lipídico. En esta diferenciación existen muchos cambios, por ejemplo, la célula aumenta su tamaño de 5 a 10 veces, sus orgánulos incrementan tanto su número como su complejidad, adquiere capacidad fagocítica, produce altas concentraciones

de enzimas líticas y secreta gran variedad de sustancias solubles (Martinez et al., 2006).

Los macrófagos son células de gran importancia ya que no solo desempeñan un papel clave en la inmunidad, sino que también ayudan a regular el desarrollo y función de los órganos. Estas células están presentes en todos los tejidos y pueden eliminar desechos celulares y patógenos, presentar antígenos a linfocitos T y producir citocinas para alertar a las células sobre el daño y promover la curación del tejido (Frodermann & Nahrendorf, 2018). Para su funcionamiento correcto, se necesita de una señal que les permite actuar, a este fenómeno se le conoce como activación.

#### 1.1.2 Activación del macrófago.

Se pueden distinguir al menos dos fenotipos diferentes de macrófagos: los macrófagos activados clásicamente (M1) y los macrófagos activados alternativamente (M2). Los macrófagos M1 pueden ser inducidos por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y lipopolisacárido (LPS) a través de la vía de señalización clásica del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B). Los macrófagos M2 se generan cuando los macrófagos se estimulan con interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13) (AlZaim et al., 2020). El LPS induce la fosforilación del inhibidor de kappa B (I $\kappa$ B) e I $\kappa$ B cinasa (I $\kappa$ K), lo que aumenta la translocación nuclear p65 para activar los macrófagos M1. Los macrófagos M1 son capaces de producir mediadores inflamatorios, como interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 23 (IL-23), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y NO-sintasa inducible (iNOS). Por lo tanto, los macrófagos M1 conducen a la inflamación, y son predominantes en su etapa temprana. En contraste, los macrófagos M2 liberan una gran cantidad de interleucina 10 (IL-10) y factores tróficos, como el factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ) y Arginasa-1 (ARG-1) que bloquean la activación de las células T y los macrófagos

M1; por lo tanto, los macrófagos M2 suprimen la inflamación y conducen a procesos de recuperación de tejidos (Y. Liu et al., 2017).

## 1.2 Proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es un sistema de defensa inmunológica esencial en los organismos. La inflamación aguda es un mecanismo de defensa de primera línea que actúa contra agentes dañinos, como patógenos, toxinas o alérgenos. En condiciones normales, las acciones estrechamente coordinadas de varios componentes de defensa, incluidas las células inmunes, los agentes antiinflamatorios endógenos y los procesos de remodelación de tejidos, permiten la resolución de la inflamación aguda al facilitar la eliminación de patógenos, células infectadas o la reparación de tejidos dañados (Chung et al., 2019).

En respuesta al daño tisular, los neutrófilos son rápidamente reclutados a los sitios inflamatorios por el endotelio activado (Novotný & Penka, 2012). El endotelio activado recluta leucocitos que se extravasan a los tejidos inflamados e incrementan el flujo de linfa que transporta células, restos celulares, donde una red de células defensivas interacciona y reacciona frente a las moléculas extrañas presentes en la linfa. Así mismo, los macrófagos y mastocitos presentes en los tejidos son reclutados (Louwe et al., 2021). Una vez activados, los macrófagos son responsables de la producción de factores de crecimiento y citocinas que atraen varios tipos de células inflamatorias a los sitios de daño (Philip et al., 2004).

Cuando la respuesta inflamatoria no se resuelve y persiste, se movilizan más componentes de defensa a lo que se conoce como inflamación crónica. La inflamación crónica se caracteriza por mantener un proceso inflamatorio de bajo grado durante un período prolongado e involucra macrófagos acumulados, linfocitos y otros componentes celulares (Chung et al., 2019). En la inflamación crónica, el proceso inflamatorio puede empezar aun cuando no haya lesión, puede ser causada por infecciones que no desaparecen, por reacciones inmunitarias anormales o por alteraciones crónicas como la obesidad. Con el tiempo, la inflamación crónica puede

causar daño al ADN y enfermedades asociadas a este proceso, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras (Zhao et al., 2016).

Clínicamente, el dolor está ausente o es mínimo. La inflamación crónica puede pasar desapercibida hasta que es demasiado tarde para revertir el daño en los órganos afectados.

### 1.2.1 Fisiopatología de la inflamación.

La inflamación es una defensa biológica contra la infección y el daño tisular. En circunstancias normales, la inflamación termina rápidamente después de la eliminación de los agentes perjudiciales. Cuando se presenta una condición patológica con desregulación en los mediadores inflamatorios se afectan los vasos sanguíneos y se genera disfunción tisular (Suzuki et al., 2020). La creciente evidencia sugiere un vínculo entre la inflamación y afecciones de salud crónicas, como:

- Enfermedades cardiovasculares: Cardiopatía coronaria, cardiopatía reumática, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas
- Enfermedades respiratorias: Asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alergias respiratorias
- Enfermedades digestivas: Gastroenteritis, colitis ulcerosa, peritonitis, enfermedad inflamatoria intestinal
- Enfermedades autoinmunes: Lupus eritematoso sistémico, encefalomiелitis autoinmune, esclerosis múltiple, artritis reumatoide
- Otras enfermedades: Obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, hepatitis, retinopatía (Zhong & Shi, 2019).

### 1.2.2 Reacción inflamatoria.

La inflamación ocurre en la microcirculación y se caracteriza por el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos de la sangre a los tejidos. El proceso es regulado por sustancias que actúan directamente sobre las diferentes poblaciones celulares, estas sustancias son secretadas principalmente por mastocitos, basófilos, plaquetas, células fagocíticas y endoteliales (Fioranelli et al., 2021). Las etapas de la respuesta inflamatorias son:

- Quimiotaxis

Es el desplazamiento por atracción que realiza una célula a lo largo de un gradiente de concentración de una molécula atrayente. A través de este proceso migran y se acumulan células en el sitio dañado. Por la acción de las sustancias quimioatrayentes como IL-8, C5a, histamina, LTs, LPS, restos de fibrina o de colágena, las áreas lesionadas reclutan otros tipos celulares, principalmente células de la circulación, y aquellas que se encuentran en reposo adheridas a las paredes endoteliales. Inicialmente se captan neutrófilos y posteriormente participan monocitos, fagocitos y linfocitos. Las células tisulares (cebadas, fibroblastos, queratinocitos), adyacentes a la zona infectada o lesionada, son las primeras en llegar, en ser activadas y en promover la inflamación (Rojas-Dotor et al., 2009).

- Aumento del diámetro vascular

Este cambio vascular, inducido principalmente por las sustancias inflamatorias: histamina, bradisinina, eicosanoides, que son secretadas desde los primeros segundos por los mastocitos locales, los basófilos y las células endoteliales activadas, aumentan el flujo de sangre hacia el área inflamada, lo que genera elevación de la temperatura y enrojecimiento local (calor y rubor), señales físicas características de un proceso inflamatorio (Ashina et al., 2015).

- Aumento de la permeabilidad vascular

La dilatación capilar permite el paso de líquido intersticial y proteínas sanguíneas (entre las que se encuentra el complemento e inmunoglobulinas) a la zona dañada, que al acumularse producen edema. La distensión de los tejidos, la acción de la bradisinina y el estímulo que todo lo anterior ejerce sobre las terminaciones



nerviosas, origina el dolor, otra de las cuatro manifestaciones clínicas cardinales más importantes de la inflamación (Köckerling et al., 2013).

- Adherencia y rodamiento celular

Inicialmente los neutrófilos (posteriormente los monocitos), se unen a las células endoteliales a través de las moléculas de adhesión de baja afinidad denominadas selectinas. Los leucocitos se desplazan sobre las células endoteliales de las vénulas postcapilares mediante un mecanismo denominado rodamiento. Las quimiocinas se adhieren a la superficie de los leucocitos en rodamiento e inducen en ellos la expresión de otros grupos de moléculas de adherencia de alta afinidad: las integrinas. Asimismo, la IL-1 y el TNF actúan sobre las células endoteliales para que aumente la expresión de los ligandos para las integrinas de los leucocitos, con lo que se establece una unión firme entre ambas células (Albelda et al., 1994).

- Estimulación de la vía extrínseca de coagulación

En forma simultánea a los eventos señalados, se inicia esta vía. El proceso culmina con la formación de fibrina y un estado procoagulante, lo que impide la diseminación de gérmenes a través de la circulación sanguínea (Mackman et al., 2007).

- Transmigración o diapédesis celular

El rodamiento de leucocitos sobre las células endoteliales culmina con el paso de los leucocitos hacia el foco infeccioso o el tejido lesionado. Los leucocitos pueden pasar a través de las uniones intercelulares. La proteína JAM, las ocludinas y la cadherina mantienen las uniones laterales de las células endoteliales, al momento de la transmigración se ha observado una pérdida focal de esta última molécula, lo que favorece la apertura. Los leucocitos también pueden pasar de manera transcelular, para lograrlo, los neutrófilos extienden pseudópodos al interior de la célula endotelial; esta vía es guiada predominantemente por quimiocinas. Una vez que los leucocitos han traspasado la barrera endotelial, pueden llegar al tejido inflamado, guiados por las señales quimioatrayentes (Schenkel et al., 2002). En el sitio de la inflamación, las células fagocíticas endocitan al antígeno, lo procesan y lo convierten en pequeños péptidos, que unidos a moléculas del complejo principal

de histocompatibilidad (MHC) pueden ser presentados a los linfocitos T. De esta manera, se induce la participación de la inmunidad específica, con lo que se potencializa notablemente la respuesta inmune ante los agresores o causantes de la inflamación. Si la respuesta inflamatoria aguda local es exitosa, el agresor es eliminado, el daño no se extiende, disminuyen notablemente las manifestaciones sistémicas, la respuesta es inhibida oportunamente, finaliza en poco tiempo y el tejido es reparado satisfactoriamente. Si por el contrario, el proceso no limitó el daño, la inflamación aguda local, se transforma en un proceso sistémico o crónico (Jaczewska et al., 2014).

### 1.2.3 Mediadores inflamatorios.

El mecanismo de inflamación representa una cadena de respuestas organizadas y dinámicas que incluyen eventos celulares y vasculares con secreciones humorales específicas. Mediadores inflamatorios son liberados por las células de defensa inmune, los mediadores inflamatorios son sustancias activas que inician, regulan y ajustan la respuesta inflamatoria (Abdulkhaleq et al., 2018).

Los mediadores inflamatorios se clasifican con base a sus propiedades bioquímicas:

- Mediadores derivados de lípidos

El ácido araquidónico (AA) es el precursor eicosanoide principal y constituyente básico en todas las células del cuerpo. La activación de varias enzimas fosfolipasa, principalmente fosfolipasa A2 (PLA2), causa la liberación de AA de la membrana celular. El AA se metaboliza a través de diferentes vías y forma múltiples productos oxigenados llamados eicosanoides. La ciclooxigenasa (COX) forma prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs), mientras que las lipoxigenasas (LOX) forman leucotrienos (LTs) y lipoxinas (LXs) (D. Wang & DuBois, 2010).

Las PG y TX se engloban sustancialmente en la conservación del proceso inflamatorio, al aumentar la permeabilidad vascular y fortalecer el resultado de otros mediadores inflamatorios como la histamina y, por lo tanto, contribuyen al

enrojecimiento, el aumento del flujo sanguíneo y la exudación plasmática en el área de inflamación aguda que conduce al edema (D. Wang & DuBois, 2010).

- Citocinas proinflamatorias

Las citocinas regulan la respuesta inmune y el proceso inflamatorio. Son mensajeros autocrinos, paracrinos o endocrinos de pequeño peso molecular. Las citocinas envían señales intracelulares al unirse a receptores específicos de la superficie celular, son producidas por prácticamente todas las células y tienen una amplia variedad de funciones. El efecto biológico depende de la citocina y la célula involucrada, pero típicamente estas moléculas afectan la activación, división, apoptosis o movimiento celular.

Las citocinas producidas por leucocitos con efectos principalmente sobre otros glóbulos blancos se denominan interleucinas. Las citocinas que tienen actividad quimioatrayente se llaman quimiocinas, aquellas que causan diferenciación y proliferación de células madre se llaman factores estimulantes de colonias, aquellos que interfieren con la replicación viral se denominan interferones (Müller et al., 2019). Las citocinas tienen la capacidad de regular la expresión de moléculas de adhesión, el crecimiento y la división celular, la apoptosis, la producción de inmunoglobulinas y la quimiotaxia en las células diana. La estimulación de monocitos y macrófagos libera citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Praveena et al., 2010).

- Mediadores vasoactivos

La histamina, almacenada principalmente en los mastocitos, leucocitos y basófilos, es un mediador proinflamatorio ampliamente distribuido y preformado. La liberación de histamina causa un aumento transitorio de la permeabilidad después de una lesión tisular. La histamina induce la acumulación de las células endoteliales y permite el paso de las proteínas a través de las uniones interendoteliales. Además, del aumento en la permeabilidad vascular, la histamina también causa la formación de edema y mejora la secreción de ácido gástrico y a mayor concentración causa

hinchazón de las células endoteliales y adherencia a los leucocitos (Larsen & Henson, 1983).

- Especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es fundamental para la progresión de muchas enfermedades inflamatorias. Las ROS son producidas por células que están involucradas en la respuesta de defensa del huésped (células PMN). Las ROS actúan como una molécula de señalización y un mediador de la inflamación (Biswas, 2016).

Las ROS se definen clásicamente como metabolitos parcialmente reducidos de oxígeno que poseen fuertes capacidades oxidantes. Son perjudiciales para las células a altas concentraciones al oxidar componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN (Mittal et al., 2014), pero a bajas concentraciones, cumplen funciones de señalización complejas.

A concentraciones fisiológicas, las ROS funcionan como moléculas de señalización que regulan el crecimiento celular, la adhesión de las células hacia otras células, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis. El concepto de producción crónica o prolongada de ROS se considera central para la progresión de la enfermedad inflamatoria. Los miembros de la familia ampliamente estudiados y comprendidos son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Thannickal & Fanburg, 2000).

Las ROS se generan como subproductos del metabolismo celular a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, así como a través del citocromo P450. La otra fuente importante de ROS son las oxidasas NADPH que están presentes en una variedad de células, especialmente los fagocitos profesionales y las células endoteliales, que son fundamentales para la génesis de la respuesta inflamatoria (Pendyala & Natarajan, 2010).

- Sistema del complemento

El sistema del complemento hace referencia a un conjunto de más de 20 proteínas que circulan por la sangre, entre ellas están las C3b, C1q, C1r, C1s, convertasa C3, C5, complejo de ataque a la membrana, entre otras. Muchas de estas proteínas están normalmente inactivas, pero en respuesta al reconocimiento de componentes moleculares en los microorganismos, pueden activarse secuencialmente a través de una cascada enzimática (Gebhardt et al., 2009).

La activación en cascada del complemento da como resultado la formación de anafilatoxinas C3a, C5a y complejo de ataque de membrana C5a, es un potente quimioatrayente que causa una mayor producción de anticuerpos; síntesis, y liberación de citocinas, PGs, LTs y estrés oxidante. También favorece el reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos T. El sistema del complemento juega un papel crítico en la inflamación y defensa contra algunas infecciones bacterianas (Gebhardt et al., 2009).

### 1.3 Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Un modelo farmacológico experimental puede considerarse relevante cuando los efectos obtenidos en este pueden vincularse *a posteriori* con experimentos preclínicos. Se han descrito varios métodos *in vivo* como el modelo de TPA e *in vitro*, como los modelos de cultivo celular para que en el futuro se puedan evaluar en ensayos preclínicos de fármacos antiinflamatorios (Butterweck & Nahrstedt, 2012).

#### 1.3.1 Edema de oído inducido por TPA *in vivo*.

El edema de oído causado por el aceite de crotón o su principio irritante 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) se ha utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria de los medicamentos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. La inflamación del oído inducida por TPA representa un modelo de

inflamación de la piel útil para la evaluación de compuestos antiinflamatorios sistémicos y locales. La administración tópica de aceite de croton causa vasodilatación, promueve la permeabilidad vascular, la afluencia de neutrófilos, la síntesis de eicosanoides y la liberación de serotonina e histamina. El modelo TPA es valioso para la detección de extractos de hierbas y compuestos antiinflamatorios sintéticos. PGI<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub> (Prostaglandina I<sub>2</sub> y Leucotrieno B<sub>4</sub>) son principalmente responsables de la permeabilidad vascular aumentada. Por lo tanto, se espera que los compuestos inhibidores de COX y LOX inhiban la inflamación inducida por TPA. Además, los efectos proinflamatorios del TPA se ven facilitados por la estimulación de la proteína quinasa C (PKC) que posteriormente activa otras enzimas como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la PLA<sub>2</sub> (Fosfolipasa A<sub>2</sub>). Los inhibidores y corticoides de COX, LOX y PLA<sub>2</sub> tienen la capacidad de suprimir la inflamación que ocurre después de la aplicación tópica de TPA (Inoue et al., 1989).

Ventajas: Estos modelos son apropiados para el cribado de fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. En el modelo de edema de oído inducido por TPA, los resultados más potentes y menos potentes están relacionados con los inhibidores de COX y LOX, respectivamente (Boller et al., 2010).

Limitaciones: Como múltiples mecanismos están involucrados en el modelo de edema de oído inducido por aceite de croton/TPA, es racional usar estos modelos solo para predecir en lugar de aprobar el modo de acción de los compuestos antiinflamatorios. Por lo general, los animales se sacrifican al finalizar el protocolo experimental para cosechar las muestras de tejido y los ganglios linfáticos auriculares para investigaciones detalladas (Boller et al., 2010).

### 1.3.2 Modelo de estimulación de macrófagos con LPS *in vitro*.

Los macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS se utilizan generalmente para evaluar el efecto antiinflamatorio de la sustancia a evaluar. La estimulación de tales células con LPS produce citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas (IL-8, MCP-1). La gravedad de la inflamación se evalúa a través de la manifestación de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NO, COX-1 y COX-2 en

sobrenadantes celulares. Los niveles de citocinas se pueden medir *in vitro* utilizando kits ELISA. La expresión de mediadores proinflamatorios está controlada por varias vías de señalización y factores de transcripción (Agarwal et al., 2014).

#### 1.4 Tratamientos farmacológicos para la inflamación.

Los medicamentos antiinflamatorios pueden interferir en la fisiopatología de la inflamación, buscando minimizar el daño tisular y proporcionar una mayor comodidad al paciente (Nunes et al., 2020).

Los glucocorticoides y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los medicamentos más comúnmente recetados en todo el mundo para el tratamiento de trastornos asociados con la inflamación.

Los glucocorticoides actúan inhibiendo las PGs y proteínas implicadas en procesos inflamatorios, como los corticoides, que entre otras indicaciones se utilizan en el tratamiento del asma y la respuesta inflamatoria autoinmune. Los fármacos no esteroideos, por otro lado, tienen una acción inhibitoria a través de la enzima COX y están indicados para el dolor moderado a leve y el control de la temperatura corporal (Golden et al., 2018).

Los AINEs son los medicamentos más utilizados en todo el mundo, utilizados para tratar el dolor agudo y crónico resultante de un proceso inflamatorio. Los AINEs abarcan una amplia gama de agentes y, en general, todos sus efectos están relacionados con la inhibición de la acción de la COX en la producción de PGs y TXs (Ayyadevara et al., 2013).

El principal mecanismo de acción de los AINEs es la inhibición de la COX-1 y COX-2, tanto central como periférica, que interfiere en la conversión de AA en PGs E2, prostaciclina y TXs. Las enzimas relacionadas con la acción de los AINE se pueden dividir en COX-1 y COX-2, actuando en diferentes regiones. La COX-1 se expresa en la mayoría de las células, incluso en el líquido fetal y amniótico, y participa en efectos fisiológicos, como efectos reguladores y protectores. Por otro lado, la COX-2 se activa por inflamación y citocinas proinflamatorias (Moon et al., 2010).

Hay varias maneras de clasificar los AINEs; según la potencia inhibitoria de la COX-2 sobre la COX-1, la concentración para lograr efectos clínicos, entre otros. Los AINEs se pueden clasificar en AINEs no selectivos (ketoprofeno, aspirina, naproxeno, flunixinina, meglumina y otros), inhibidores preferenciales de la COX-2 (meloxicam, etodolac, nimesulida) e inhibidores altamente selectivos de la COX-2 (celecoxib). La mayoría de los efectos secundarios están relacionados con la inhibición de la COX-1 debido a su rendimiento en varios sistemas relacionados con la limpieza celular (Hayashi et al., 2011).

Las acciones inhibitorias de los AINEs contra la COX-1 pueden presentar problemas cruciales en la farmacoterapia ya que pueden aumentar el riesgo de accidentes cardiovasculares, fundamentalmente cuando se consume en dosis elevadas y por largos períodos de tiempo. Así, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de inhibidores selectivos de la COX-2, con menores efectos secundarios adversos, ya que se requieren inhibidores de la COX-2 altamente selectivos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El primer inhibidor selectivo de la COX-2 fue el celecoxib que ha logrado una amplia diseminación (Yaghoobi et al., 2013).

Aunque los glucocorticoides pueden ser altamente efectivos en el tratamiento de la inflamación, su aplicación sistémica es limitada debido a la alta incidencia de efectos adversos graves como insuficiencia cardíaca, daños gastrointestinales, úlceras, insuficiencia renal, reacciones alérgicas de gravedad, por mencionar algunas. principalmente en el tratamiento a largo plazo. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos son un grupo heterogéneo de compuestos y la mayoría de ellos tienen una farmacocinética y farmacodinámica desfavorables, lo que lleva a efectos adversos, como trastornos gastrointestinales (Thumann et al., 2019).

Por tanto, la necesidad de sistemas de administración de medicamentos a largo plazo de antiinflamatorios con un perfil de liberación bien controlado es evidente (L. et al., 2013).

### 1.5 El LPS como factor del proceso inflamatorio por la vía de NF- $\kappa$ B.



El sistema inmune innato reconoce microorganismos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Un ejemplo de estos receptores son los receptores tipo toll (TLR) (P. L. Huang, 2009). Los PRR reconocen los componentes microbianos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son esenciales para la supervivencia del microorganismo, entre los que destaca el LPS. El reconocimiento de un PAMP por un PRR desencadena reacciones inflamatorias rápidas esenciales para la inmunidad innata (Takeda, 2004).

El LPS es una endotoxina, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gram negativas; está compuesto por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos. Se caracteriza por una inducción robusta de la respuesta inflamatoria sistémica en el sistema inmune innato a través de la vía del receptor tipo Toll 4 (TLR4), que puede provocar shock endotóxico, daño celular y potencialmente insuficiencia orgánica múltiple (Chae, 2018).

La activación de TLR4 por LPS, está precedida por una serie de reacciones que tienen como objetivo convertir agregados de LPS, derivados de bacterias, en monómeros de LPS concentrados en la superficie celular en las cercanías del receptor (Ciesielska et al., 2021). Estas reacciones son iniciadas por la proteína LBP sérica que se une a los agregados de LPS (micelas) que facilita la extracción posterior de monómeros de LPS por CD14 y la entrega del LPS al complejo TLR4/MD-2. La interacción de TLR4/MD-2 con dos moléculas de LPS induce la dimerización de los ectodominios de dos moléculas TLR4 que adquieren una "forma de M" con sus fragmentos intracelulares puestos en yuxtaposición. Cada fragmento intracelular contiene un dominio de homología Toll/IL-1R (TIR) propenso a interacciones homotípicas con dominios TIR de cuatro proteínas adaptadoras (Griffin et al., 2018). Cuando está en la membrana plasmática, TLR4 interactúa con el primer par de adaptadores, TIRAP. El TIRAP unido a TLR4 recluta a MyD88, el cual se une aún más a la cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK) 1 y 2, y se forma un complejo de señalización submembrana llamado mixedosoma (Davis et al., 2020). El mixedosoma ensamblado recluta a E3 ubiquitina ligasa

TRAF6, que desencadena una cascada de señalización que involucra a la cinasa TAK1 y conduce, a través de la fosforilación y activación de las cinasas I $\kappa$ B  $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ ), a la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Una vez en el núcleo activa la transcripción de genes que están implicados en la respuesta inflamatoria inducida por LPS (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 y COX-2) (Akira et al., 2006).

#### 1.5.1 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B).

Un factor de transcripción nuclear es un tipo de proteína que se une a una secuencia de nucleótidos conservados en la región promotora del gen para iniciar la transcripción de este gen. El factor nuclear de la cadena  $\kappa$ -ligera de células B activadas por potenciadores (NF- $\kappa$ B) es uno de los factores de transcripción nuclear con una amplia gama de funciones biológicas, que existe en casi todos los tipos de células de mamíferos (Bottex-Gauthier et al., 2002). NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción nuclear que sirve de defensa en aquellas condiciones que atentan contra la homeostasis, como son las infecciones virales y bacterianas, o por algún tipo de estrés físico. Cuando las células se exponen a estímulos endógenos, como citocinas proinflamatorias, una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de los inhibidores de NF- $\kappa$ B, por lo que es liberado para entrar al núcleo y activar la expresión de varios genes diana (T. Liu et al., 2017). Estos complejos citoplasmáticos son capaces de efectuar una translocación nuclear, también son conocidos como la familia de transcripción NF- $\kappa$ B/Rel. Esta incluye a NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, y c-Rel. La forma activada de NF- $\kappa$ B que más prevalece es un heterodímero que consiste en la subunidad p50 y p65, la cual contiene dominios de transactivación necesarios para la inducción de varios genes diana (Vallabhapurapu & Karin, 2009). NF- $\kappa$ B existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada a proteínas reguladoras llamadas inhibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), de los cuales, los más importantes son I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . La fosforilación de I $\kappa$ B es un paso importante en la activación de NF- $\kappa$ B, el cual está mediado por un complejo de proteínas cinasas llamado IKK. El complejo IKK contiene al menos tres subunidades, que incluyen las cinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (también

llamadas IKK1 e IKK2, respectivamente), y la subunidad reguladora IKK $\gamma$  (también denominada NEMO). La activación de IKK inicia con la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en sus regiones -NH<sub>2</sub> terminales específicos de residuos de serina. I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado es entonces ubiquitinizado, convirtiéndose en un blanco para la degradación por el proteosoma 26S, liberando el dímero NF- $\kappa$ B del complejo NF- $\kappa$ B–I $\kappa$ B citoplasmático y las proteínas NF- $\kappa$ B se translocan al núcleo, donde se unen a elementos específicos en las regiones promotoras de los genes diana para activar así la expresión génica de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, NF- $\kappa$ B está estrictamente regulado para mantener la homeostasis (Mitchell et al., 2016).

Si la activación de NF- $\kappa$ B es desregulada, pueden ocurrir enfermedades como inflamación crónica, tumores, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares, por ejemplo, en la inflamación del tejido adiposo inducida por obesidad y la resistencia a la insulina mediante la desregulación de NF- $\kappa$ B (Zhang et al., 2021).

### 1.6 Inflamación del tejido adiposo.

Está bien establecido que la infiltración de células inflamatorias en la expansión del tejido adiposo causa disfunción de adipocitos y disfunción metabólica, como intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Los macrófagos fueron la primera población de células inmunes que estudió en este proceso, aunque informes más recientes han enfatizado el papel de la infiltración temprana de neutrófilos (Weisberg et al., 2003).

Durante las respuestas inflamatorias locales y sistémicas, los macrófagos residentes en el tejido presentan antígenos para iniciar el reclutamiento de otras células inmunes y secretan citocinas para regular las cascadas de señalización inflamatoria en el tejido huésped. La relevancia de este fenómeno es confirmada por varios informes clínicos que demuestran la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo de humanos obesos (Kawai et al., 2021).

La obesidad puede asociarse con un estado de resistencia a la insulina en el tejido adiposo, hepático y músculo esquelético que está asociado con un proceso

inflamatorio de bajo grado. La obesidad es considerada un factor de riesgo importante para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La resistencia a la insulina en el contexto de la obesidad es el resultado de una combinación de funciones alteradas de las células diana de la insulina y la acumulación de macrófagos que secretan mediadores proinflamatorios (Olefsky & Glass, 2010).

El tejido adiposo no es simplemente un depósito de almacenamiento de calorías, sino que también secreta activamente ácidos grasos y una variedad de polipéptidos. Estos péptidos incluyen hormonas, citocinas y quimiocinas, que pueden funcionar de manera endocrina o paracrina (Izaola et al., 2015). El tejido adiposo consta de una variedad de tipos de células, que incluyen adipocitos, células inmunes (macrófagos y linfocitos), preadipocitos y células endoteliales. La acumulación de macrófagos se correlaciona directamente con el grado de obesidad. Los macrófagos son una fuente importante de citocinas inflamatorias, que pueden causar disminución de la sensibilidad a la insulina. Esta variedad de citocinas contribuye a reclutar macrófagos adicionales, estableciendo un proceso de retroalimentación positiva que propaga el estado inflamatorio crónico (Peleli et al., 2020). Las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , en conjunto con otros factores secretados por los macrófagos, ejercen efectos paracrinos para activar las vías inflamatorias de las células diana de la insulina. Esto conduce a la activación de la cinasa Jun N-terminal (JNK), el inhibidor de la  $\kappa$ B cinasa (IKK) y de otras serinas cinasas. En un estado de resistencia a la insulina, la señalización de JNK e IKK se regula al alza en el músculo esquelético, el tejido adiposo y otros tejidos resistentes a la insulina. Esto es importante, ya que estas serinas cinasas activan factores de transcripción y la principal vía proinflamatoria dentro de los macrófagos que involucra al sistema IKK $\beta$ / factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que luego estimulan la transcripción de un conjunto superpuesto de genes de vías inflamatorias (P. L. Huang, 2009). Estas serinas cinasas también pueden fosforilar proteínas de sustrato del receptor de insulina (IRS), los receptores de insulina y posiblemente otras moléculas de señalización de insulina. Estos eventos de fosforilación de serina interfieren con la acción normal de la insulina, creando un estado de resistencia celular a la insulina (Pelka & De Nardo, 2018).

Considerando el papel relevante que tiene NF- $\kappa$ B sobre el proceso inflamatorio, se ha considerado un blanco terapéutico muy importante, y se han propuesto algunas moléculas que puedan actuar sobre su vía de señalización o sobre las citocinas que modula. Sin embargo, existen moléculas endógenas que tienen la capacidad de establecer regulación sobre dicho factor, por ejemplo los agonistas a receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Giacoman-Martínez et al., 2019).

### 1.7 PPAR's e inflamación.

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ ) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, que actúan como factores de transcripción que son activados por ligandos endógenos, como ácidos grasos, principalmente no saturados. Desempeñan un papel crucial en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, siendo blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, siendo también interesantes blancos para el tratamiento de enfermedades que cursan procesos inflamatorios, como la hipertensión, entre otros. Los agonistas para los PPARs, puede mostrar cierta mejoría con respecto a la aparición de efectos secundarios, lo que ha llevado a aumentar el valor terapéutico para diferentes enfermedades como el cáncer, la inflamación y las enfermedades cardiovasculares (Mirza et al., 2019).

PPAR $\gamma$  es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que está regulado por los ácidos grasos libres y sus metabolitos. PPAR $\gamma$  es necesario para el desarrollo de los adipocitos y es la molécula blanco de las tiazolidinedionas (TZD), sensibilizadores a la insulina, que se utilizan clínicamente para el tratamiento de la DT2 (Han et al., 2017). PPAR $\gamma$  también se expresa en macrófagos, donde puede regular negativamente genes de la vía inflamatoria, inhibiendo la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, además de regular la homeostasis de glucosa. Otro miembro de la familia PPAR, es PPAR  $\beta/\delta$ , ejerce influencias similares sobre la activación de macrófagos

de un fenotipo M2 (antiinflamatorio). La inhibición de PPAR $\beta/\delta$  conduce a intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, con una mayor liberación de citocinas proinflamatorias (Shao et al., 2016).

Considerando que la DT2 se caracteriza por presentar un estado inflamatorio crónico, el tratamiento con agonistas a PPAR $\gamma$  como las TZD, podrían garantizar su uso para la prevención de complicaciones macrovasculares de la DT2. En diferentes modelos biológicos, el tratamiento con TZD disminuye la expresión de NF- $\kappa$ B nuclear en las células PMN que circulan en la sangre, mientras aumenta, en las mismas células PMN, la expresión de I $\kappa$ B, un inhibidor de NF- $\kappa$ B, llevando a cabo una disminución inflamatoria. Las TZD reducen la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , demostrando así propiedades antiinflamatorias (Consoli & Devangelio, 2005). Las propiedades antiinflamatorias de las TZD ocurren por dos vías biomoleculares: transactivación y transrepresión. En la transactivación, las TZD se unen a PPAR $\gamma$ , induciendo cambios conformacionales que conducen al reclutamiento de proteínas y coactivadores. Entonces, PPAR $\gamma$  forma un heterodímero con el receptor de retinoide X y reconoce elementos de respuesta de ADN específicos llamados elementos de respuesta de PPAR (PPRE) en la región promotora de los genes diana. Esto resulta en última instancia en la transcripción de genes diana de PPAR $\gamma$ , implicados en el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana celular, en la activación a derivados acil-CoA, en la entrada a la mitocondria, en la degradación de los ácidos grasos a través del proceso de  $\beta$ -oxidación, ya sea en las mitocondrias o en los peroxisomas, y en la síntesis de cuerpos cetónicos. En la transrepresión, los PPARs pueden reprimir la transcripción de genes al interferir negativamente con otras vías de transducción de señales, como la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, de manera independiente de la unión al ADN (Jiang et al., 1998). En macrófagos, las TZD inhiben la expresión de proteínas que se regulan positivamente durante la diferenciación y activación de los macrófagos M1, como iNOS y gelatinasa B; esto se debe a la inhibición de STAT, AP-1 y NF- $\kappa$ B (Cuzzocrea et al., 2004). La disminución en el contenido de NF- $\kappa$ B ocurre porque las TZD aumentan las concentraciones de I $\kappa$ B total (Ghanim et al., 2001).

A pesar de que los fármacos agonistas a PPAR $\gamma$  poseen un importante efecto sensibilizador de la insulina, no son considerados la alternativa terapéutica a largo plazo para el tratamiento de la DT2, ya que entre sus efectos indeseables se puede ubicar la estimulación de la lipogénesis en diversos tejidos y el consecuente aumento de peso. Por ello, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de moléculas agonistas duales a PPARs. Un agonista a PPAR $\delta/\gamma$ , favorece la incorporación de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos, disminuyendo tanto glucosa, lípidos en sangre y la inflamación crónica de bajo grado, resolviendo la problemática de los agonistas de PPAR $\gamma$  (Hsueh & Law, 2003).

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios y sensibilizadores a la insulina a partir de medicina tradicional se está popularizando con el objetivo de obtener moléculas con múltiples blancos terapéuticos, que ofrezcan un potencial tratamiento integral de enfermedades complejas como la DM2 y el síndrome metabólico (S. Wang et al., 2016).

### 1.8 Medicina tradicional usada en la inflamación.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 65% de la población mundial incorpora la medicina tradicional (usos etnobotánicos) en la atención médica. Los estudios etnobotánicos a lo largo de los años han permitido la asociación de plantas altamente diversificadas con actividades biológicas, desde la observación, descripción e investigación experimental, lo que ha contribuido en gran medida al descubrimiento de productos naturales con acción biológica. El uso de compuestos naturales a base de plantas medicinales para tratar muchas enfermedades se ha convertido en una gran tendencia en la investigación clínica. Los compuestos polifenólicos han atraído una atención significativa debido a sus efectos de modulación sobre la inflamación (Owona et al., 2020).

Las plantas medicinales siguen siendo una fuente interesante de productos naturales para el tratamiento de diversas condiciones de salud. Se estima que se han estudiado más de 150.000 especies de plantas, muchas de las cuales contienen

valiosos agentes terapéuticos, y las aplicaciones de nuevos compuestos de plantas con fines farmacéuticos han ido aumentando gradualmente en los últimos años (Anand, 2020).

La inflamación es un gran desafío para la humanidad. Aunque hay muchos medicamentos antiinflamatorios disponibles, se cree que estos medicamentos, como los opioides y los medicamentos que inducen analgesia como los AINEs, no son útiles en todos los casos y estos medicamentos también producen efectos secundarios, por lo que, para superar estos problemas, se deben descubrir nuevas moléculas de medicamentos a partir de las plantas. Las plantas tienen muchos fitoconstituyentes útiles para reducir la inflamación y menos efectos secundarios (Atanasov et al., 2015).

Las sustancias de origen vegetal, pertenecientes a las más diversas clases químicas, ya han demostrado una actividad antiinflamatoria probada. Entre ellos, destacan los terpenos, polifenoles ( taninos, cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), glicósicos (saponinas) y alcaloides (Singh et al., 2015).

Dado que una gran proporción de los AINEs disponibles en el mercado tienen efectos indeseables significativos, la necesidad de nuevos medicamentos antiinflamatorios contribuye al avance de la investigación de moléculas más selectivas y con menores efectos adversos, siendo las plantas medicinales un recurso importante en la búsqueda de nuevas moléculas con estas características. Por lo tanto, hay que tomar en cuenta el número significativo de sustancias de origen vegetal forman parte del arsenal terapéutico de la medicina moderna (Corlett, 2016).

## 2 ANTECEDENTES



## 2.1 *Hibiscus Sabdariffa*

*Hibiscus sabdariffa* L. (*Malvaceae*) es una planta cultivada, cuyos sépalos se utilizan en varios países para preparar una bebida fría, como parte de la gastronomía local. Además, a la preparación acuosa se la han atribuido ciertos usos medicinales, principalmente como diurético y agente anti obesidad (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

Tradicionalmente *Hibiscus sabdariffa* se cultiva en Sudán, Egipto, Nigeria, México, Arabia Saudita, Taiwán y América Central, la partes más utilizadas son el tallo, hojas, cálices y semillas, partes de la planta que tiene aplicaciones tradicionalmente como alimento, en bebidas herbales, cosmética, como agente aromatizante en la industria alimentaria y como medicina herbal (Lee & Zietsch, 2011).

Muchos informes de investigación destacaron que los cálices secos son la fuente potencial de moléculas bioactivas que ejercen una potente actividad antioxidante, acción antiinflamatoria, antiobesidad, antihiperlipidémico, antihipertensivo, inhibición de la agregación de plaquetas sanguíneas, diurético, antiurólítico, antimicrobiano, anticancerígeno, hepatoprotector, renoprotector, antitumoral y propiedades inmunomoduladoras (Riaz & Chopra, 2018).

Varios estudios de *Hibiscus sabdariffa* han reportado efectos benéficos para la salud y podría usarse como un tratamiento terapéutico de diversas enfermedades particularmente en desórdenes metabólicos, como DT2 y obesidad. Su composición química también mostró que la potencia terapéutica de *Hibiscus sabdariffa* podría atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos, como flavonoides (quercetina, luteolina); ácido clorogénico, gosiptina, hibiscetina, fenoles, algunos ácidos fenólicos, glucósidos como la delphinidina-3-sambubósido y la cianidina-3-sambubósido se detectaron como los componentes principales en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* (Ojulari et al., 2019).

Estudios fitoquímicos de *Hibiscus sabdariffa* han permitido identificar a compuestos como la  $\alpha$ -amirina y lupeol, los cuales poseen acción antihiperglucemiante en ratones normales CD1, efecto agonista dual de PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$  en adipocitos

3T3-L1 La activación simultánea de estas isoformas mejora la sensibilidad a la insulina, aumentando la captación de glucosa a través de la activación de PPAR $\gamma$  y promoviendo la captación y oxidación de lípidos mediante la activación de PPAR  $\beta/\delta$ , evitando la acumulación de triglicéridos en adipocitos 3T3-L1 (Giacoman-Martínez et al., 2019). Además  $\alpha$ -amirina actúa como un activador alostérico de AMPK, y puede estar relacionada con la translocación de GLUT4. Estos datos apoyan que  $\alpha$ -amirina podría tener una acción insulino-mimética en los mioblastos C2C12 y debe considerarse como una molécula bioactiva para nuevos fármacos multiobjetivo con utilidad en DT2 y otras enfermedades metabólicas (Giacoman-Martínez et al., 2021).

## 2.2 Lupeol.

Lupeol es un triterpeno natural que existe ampliamente en plantas medicinales. Se ha demostrado que este compuesto posee una amplia gama de actividades farmacológicas, como acciones anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Suprime el reclutamiento de macrófagos mediado por inhibidor del activador del plasminógeno 1 y atenúa la polarización de macrófagos M1 (K. Liu et al., 2021).

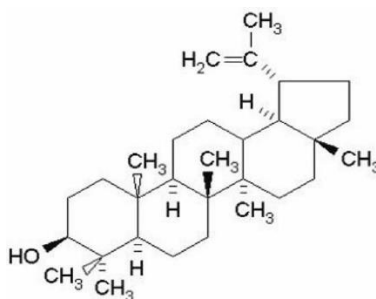


Figura 1. Estructura química de lupeol tomada de (Saleem, 2009).

Se ha demostrado que el lupeol exhibe diversas actividades farmacológicas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Estos incluyen actividad contra la inflamación, el cáncer, la artritis, la diabetes, las enfermedades cardíacas, la toxicidad renal y la toxicidad hepática (Preetha et al., 2006 & Sudhahar et al., 2006).

### 2.2.1 Lupeol e inflamación.

Lupeol ha sido ampliamente estudiado por sus efectos inhibitorios sobre la inflamación, tanto en modelos *in vitro* y en modelos animales de inflamación. El estudio realizado por Fernández et al., mostró que la aplicación tópica de lupeol (1 mg/oreja) alivió la inflamación inducida por el acetato de 12-0-tetradecanoilforbol (TPA) o ácido araquidónico en un modelo de edema auricular de ratones suizos (Fernández et al., 2010). Este estudio mostró que la aplicación tópica de lupeol disminuye los niveles de mieloperoxidasa (marcador específico de neutrófilos), lo que causa una reducción de la infiltración celular en tejidos inflamados en ratones (Fernández et al., 2010).

Geetha et al., informaron por primera vez la utilidad de lupeol para tratar o reducir la inflamación en un modelo murino de artritis, que es una enfermedad asociada a la inflamación. Se demostró que el efecto benéfico de lupeol en el tratamiento de la inflamación en ratones con artritis se asocia con un potencial efecto modulador sobre el sistema inmunológico y la generación de factores inflamatorios. Se mostro también que el lupeol suprime la actividad fagocítica de los macrófagos y los linfocitos T, y suprime la generación de citocinas mediadas por células T CD4+ en un modelo de ratón. La administración oral de lupeol (125-200 mg/kg) dio lugar a una reducción significativa del conteo de linfocitos T CD4+ y CD8+ y del nivel de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4) en ratones con artritis experimental (Geetha & Varalakshmi, 1999).

El estudio de Vasconcelos et al., probó el tratamiento del lupeol sobre la inflamación de un modelo de ratón de asma bronquial. Está bien establecido que el asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, asociada con una respuesta inmune Th2. Este estudio se mostró que la administración de lupeol causa una reducción significativa en los niveles de eosinófilos en el líquido broncoalveolar. También se encontró que el tratamiento de lupeol reduce la inflamación general en los pulmones. Se observó que el efecto antiinflamatorio de lupeol era igual a la dexametasona, un agente antiinflamatorio con probada potencia farmacológica (Vasconcelos et al., 2008).

Se llevaron a cabo varios estudios para comprender el mecanismo molecular a través del cual lupeol inhibe o atenúa los procesos inflamatorios en situaciones *in vitro* e *in vivo*. Se mostró que el lupeol regula varias moléculas que desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio, tanto de manera directa como indirecta. Asimismo, se demostró que el lupeol inhibe la actividad de la lipoxigenasa-1 (Gutierrez-Lugo et al., 2004). Se observó que el tratamiento adicional con lupeol causa una reducción en la inflamación al disminuir los niveles de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en un modelo de ratón con asma bronquial (Vasconcelos et al., 2008).

### 2.3 $\alpha$ -amirina.

$\alpha$ -amirina es un triterpeno pentacíclico presente en una variedad de plantas medicinales y que muestra un amplio espectro de actividad farmacológica, dentro de las que se incluye acciones antidiabéticas, antiinflamatorias, antiulcerosas, antiartríticos, antihiperlipidémicas, antitumorales y hepatoprotectoras (revisado de Singh et al., 2015). Se ha demostrado que  $\alpha$ -amirina atenúa el síndrome metabólico inducido por una dieta alta en fructosa e inhibe la polarización de los linfocitos Th17 (Singh et al., 2015).

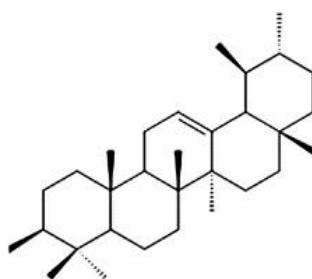


Figura 2. Estructura química de alfa-amirina tomado de (Medeiros et al., 2007).

### 2.3.1 $\alpha$ -amirina e inflamación.

Algunas pruebas experimentales muestran que la  $\alpha$ -amirina exhibe propiedades sistémicas antinociceptivas, antiinflamatorias, antipruriginosas, hepatoprotectoras y gastroprotectoras. La mezcla de triterpeno  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina produce antinocicepción periférica, espinal y supraespinal consistente en roedores, especialmente cuando se evalúa en modelos inflamatorios con dolor. Los mecanismos involucrados en las acciones de esta mezcla de compuestos parecen incluir la inhibición de las vías dependientes de la proteína quinasa A y PKC. Se ha demostrado que la aplicación tópica de  $\alpha$ -amirina es capaz de reducir, de forma dosis dependiente, tres eventos importantes relacionados con la respuesta inflamatoria cutánea inducida por TPA: formación de edema, migración de leucocitos polimorfonucleares y aumento de los niveles tisulares de IL-1 $\beta$  (Otuki et al., 2005). Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas propiedades antiinflamatorias tópicas de  $\alpha$ -amirina se comprenden parcialmente (Medeiros et al., 2007).

En conjunto, estas evidencias sugieren que la utilidad terapéutica de lupeol y  $\alpha$ -amirina para afecciones inflamatorias es de gran importancia (Saleem, 2009).

Sobre todo, en condiciones inflamatorias asociadas a desregulaciones metabólicas, donde ambos compuestos tienen un potencial terapéutico importante.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades que poseen un carácter inflamatorio crónico (como la Diabetes mellitus tipo 2) son consideradas problemas de salud pública en todo el mundo, ya que conllevan a un gran impacto social, económico y en la calidad de vida de quienes las padecen. Aunado a esto, el uso excesivo de opiáceos para aliviar el dolor en enfermedades con procesos inflamatorios crónicos presenta otro problema importante de salud. Desafortunadamente, la mayoría de los agentes antiinflamatorios de uso clínico pueden presentar efectos adversos, lo que representa un motivo muy importante para la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios más selectivos y con menores efectos adversos. En la búsqueda de alternativas terapéuticas, se tienen como candidatos importantes a los agonistas duales para PPARs, ya que su activación se ha relacionado con efectos antiinflamatorios. Sin embargo, es posible que también otras vías relacionadas con la respuesta inflamatoria (p. ej. a nivel de COX-2) participen en respuesta a estas moléculas.

*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) es una especie vegetal que se utiliza en la población mexicana como planta medicinal, considerada como un agente antiobesidad con efectos antiinflamatorios. Cabe mencionar que se han identificado a la  $\alpha$ -amirina y lupeol como moléculas con actividad agonista dual de PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ . Ambos compuestos favorecen la incorporación de glucosa y disminuyen el almacenamiento de lípidos que además han mostrado cierta actividad antiinflamatoria en diferentes modelos, sin embargo, aún no se ha evaluado el efecto de dichos compuestos sobre la producción de mediadores inflamatorios provenientes del macrófago, una entidad celular de suma importancia en cualquier proceso inflamatorio, incluyendo la generada por un desbalance metabólico. Por lo anterior, el estudio de estos compuestos contribuiría para promover su uso potencial como agentes antiinflamatorios, principalmente en enfermedades que cursan inflamación crónica, como la diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

## 4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto ejercen la  $\alpha$ -amirina y el lupeol, sobre la expresión y secreción de citocinas en la línea celular RAW 264.7 y sobre el modelo de edema murino por TPA?

## 5 HIPÓTESIS

Si los agonistas duales de PPAR $\delta$ / $\gamma$ ,  $\alpha$ -amirina y lupeol, poseen actividad antiinflamatoria, modificarán la expresión y secreción de citocinas en cultivo de macrófagos RAW 264.7 y reducirán el edema inflamatorio en el modelo murino de TPA.

## 6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto y actividad antiinflamatoria del  $\alpha$ -amirina y lupeol en modelos *in vivo*, *in vitro* y estudios *in silico*.

## 7 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en un modelo de inflamación aguda *in vivo* (TPA).
2. Caracterizar la expresión de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) en cultivo de macrófagos tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol.
3. Determinar las concentraciones de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) en sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol.
4. Evaluar la interacción de  $\alpha$ -amirina y lupeol con la COX-2 mediante análisis de acoplamiento molecular.



## 8 DISEÑO EXPERIMENTAL

### 8.1 Obtención de los compuestos.

Los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol fueron adquiridos comercialmente de Sigma-Aldrich Products® con el número de catálogo 638-95-9 y 545-47-1, respectivamente.

### 8.2 Modelo de evaluación antiinflamatoria *in vivo*.

#### 8.2.1 Animales experimentales.

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1, de aproximadamente 6 semanas de edad, de 25 a 30 g de peso, proporcionados por la UMADI de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I). Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ambiente (aprox. 24°C) y ciclos de luz-oscuridad 12:12 h, con suministro de agua y alimento estándar para roedores *ad libitum*. El manejo de los animales experimentales se llevó a cabo de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

#### 8.2.2 Edema auricular inducido con TPA.

Los animales se clasificaron en cuatro grupos de cinco ratones a los que se les indujo un edema con TPA (Sigma Aldrich®, 5.00582), el cual se aplicó tópicamente en la oreja izquierda del ratón a una dosis de 2.5  $\mu$ g de TPA/oreja, disueltos en 25  $\mu$ L de acetona (vehículo); en la oreja derecha se administraron 25  $\mu$ L de acetona. En todos los casos, después de 30 minutos de la aplicación del TPA, se administró tópicamente a un grupo 1 mg de  $\alpha$ -amirina y a otro grupo 1mg de lupeol en la oreja tratada con TPA, ambos compuestos disueltos en 25  $\mu$ L del disolvente (solución salina). Como control positivo se administró indometacina (1 mg/oreja, Sigma Aldrich) siguiendo la misma estrategia experimental. El último grupo sólo fue tratado con TPA, y fue considerado como control negativo. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 6 h después de la aplicación del TPA. Se realizó una perforación de 6 mm de diámetro del tejido atrial del centro del pabellón auricular

con un sacabocados, a partir de ambas orejas del ratón y se registró el peso del tejido auricular. El edema inducido se cuantificó en relación con la diferencia del peso entre el tejido auricular que recibió TPA y el tejido que recibió únicamente vehículo. La inhibición del edema se determinó como porcentaje de inhibición respecto al edema formado en los animales del grupo control, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(W - W_o) - (W' - W_o')}{(W - W_o)} \times 100$$

Donde:

W = Peso de la oreja con TPA (Control)

W<sub>o</sub> = Peso de la oreja con vehículo (Control)

W' = Peso de la oreja con TPA (+ o α-amirina/lupeol)

W<sub>o</sub>' = Peso de la oreja con vehículo (+ o α-amirina/lupeol)

### 8.3 Modelo *in vitro*.

#### 8.3.1 Línea celular de macrófagos RAW 264.7 de ratón *Mus musculus*.

La línea celular RAW 264.7 fue adquirida comercialmente del banco de células American Type Culture Collection (ATTC, Rockville, MD.). Las células fueron cultivadas a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (GIBCO, UT, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino. El medio de cultivo se complementó con 1000 U/ml de gentamicina, 0.2 mM de piruvato y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Microlab, CA, EUA). Para resemebrarlas se utilizó tripsina 0.025% en PBS-EDTA 2 nM y se sembraron en botellas de plástico estériles de 75 mm<sup>2</sup> (Corning, Acton, MA, EUA); hasta llegar a confluencia (80%) y posteriormente se resemebraron en placas de 6 pozos. Una vez en confluencia se iniciaron los tratamientos con α-amirina y lupeol.

### 8.3.2 Viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de MTT, este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Se cultivaron células RAW 264.7 en placa de 96 pozos con medio DMEM y se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 h. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS y posteriormente se le agregó medio de cultivo nuevo con los tratamientos. Los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol se utilizaron a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu$ M y se dejó transcurrir 24 h, como control negativo se utilizó peróxido de hidrógeno al 1%. Pasadas las 24 h se retiró el medio y se agregó una solución de 0.1 mg/mL de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se les retiró el medio y se le agregó 200  $\mu$ L de una solución de HCl 0.04 M en 2-isopropanol durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se cuantificó a 570 nm en un lector de placas ELISA.

### 8.3.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1).

Para determinar la concentración de citocinas se usó la técnica de ELISA. Se basa en un inmunoensayo tipo sándwich con anticuerpos monoclonales específicos para las citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1), inmovilizados en una microplaca de 96 pozos en una fase sólida que contiene controles estándares. Para esto, las células se trataron con  $\alpha$ -amirina y lupeol (10  $\mu$ M) y celecoxib 10 mM durante 60 minutos, transcurrido este tiempo, las células fueron estimuladas con 5  $\mu$ g/ml de LPS durante 24 h. Posteriormente se colectó el medio de cultivo de las células con cada uno de los tratamientos y se determinaron las concentraciones utilizando ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Set de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1 (BioLegend, San Diego, CA) siguiendo las indicaciones del proveedor.

## 8.4 Análisis de la transcripción génica de citocinas inflamatorias.

### 8.4.1 Extracción de ARN total.

Para cuantificar la expresión de los genes de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 se sembraron  $1 \times 10^6$  células en una botella de 75 cm<sup>3</sup> estéril para su proliferación. Posteriormente las células se sembraron en placas de 6 pozos hasta alcanzar la confluencia. Las células se trataron con  $\alpha$ -amirina y lupeol (10  $\mu$ M) y celecoxib 10 mM durante 60 minutos, transcurrido este tiempo, se estimularon con 5  $\mu$ g/ml de LPS durante 24 h. (Se hicieron 4 repeticiones del ensayo, por triplicado). Posteriormente se colectó el medio de cultivo para los estudios de ELISA. A continuación, las células fueron lavadas con PBS. Las células fueron homogenizadas y recuperadas con Trizol®. El homogenizado se depositó en tubos eppendorf en donde se les dejó reposar en hielo. Posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 20 s. Las muestras se centrifugaron a 11,700 x g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (fase incolora) y se le agregó 0.5 mL de isopropanol, dejando reposar por 25 min en hielo. Después se centrifugó a 11,700 x g durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con un 1 mL de etanol al 75% y nuevamente se centrifugó a 11,700 x g durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado (ARN total) obtenido se secó al vacío. El botón de ARN se suspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de RNasas. Finalmente se cuantificó por espectrofotometría mediante el uso del NanoDrop® a una absorbancia de 260 nm y 280 nm.

### 8.4.2 Cuantificación de la expresión del ARNm de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10.

Se utilizó la técnica Transcripción en Reversa acoplado a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.

El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total utilizando la transcriptasa reversa ImProm II, para ello se ocuparon iniciadores al azar (ramdon primers 0.5 µg/µL). El volumen total de reacción de 20 µL, se incubó con la siguiente secuencia de ciclos: inicio 25 °C por 5 min, seguido de la extensión a 42°C por 55 min y por último se detuvo la reacción inactivando la enzima a 70°C por 15 min y enfriando a 4°C por 5 min.

El cDNA se amplificó mediante la tecnología LightCycler 480 SYBR Green I Master, utilizando primers específicos [0.4 µM] para los genes de IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-10 y 36B4 como gen de referencia (Tabla 1). El proceso se llevó a cabo en el equipo Techne Prime Pro-48 qPCR Real-time bajo los siguientes parámetros: Activación de la polimerasa a 95°C por 10 min; 45 ciclos de la PCR con el primer paso de 95°C por 10 s, segundo paso de 60°C por 15s, tercer paso de 72°C por 15 s; Complementada con una curva melting de gradiente: con el primer paso de 95°C por 15 s, segundo paso de 55°C por 15 s, tercer paso de 95°C por 15 s

Tabla 1. Primers utilizados en la qPCR.

PRIMER	SECUENCIA	GenBank
<i>TNF-α</i>	F5'-CCTCCCTGTCA TCAGTTCTA-3' R5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	NM_013693.1
<i>IL-6</i>	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'	NM_000071.1
<i>IL-1β</i>	F5'-TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT-3' R5'-GTCACAGAGGACGGGCTCTT-3'	NM_000068.7
<i>IL-10</i>	F5'-CAGAGCCACATGCT-3' R5'-GTCCAGCCTGGTCCT-3'	NM_000067.6
<i>36B4</i>	F5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3' R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTG GT-3'	NM_007475.2

#### 8.4.3 Docking molecular

El acoplamiento se realizó con la versión 4.2.6 del programa AutoDock utilizando el código de proteína 5JW1 del Banco de Datos de Proteínas (de sus siglas en ingles

Protein Data Bank) con una resolución de 2.81 Å para COX2. Mediante el programa computacional UCSF Chimera, la proteína 5JW1 fue minimizada, se le agregaron las cargas y retiraron las moléculas de agua  $\alpha$ -amirina y lupeol se construyeron mediante el programa Chembiodraw y se minimizaron (MMFF94) con el programa auxiliar Chem3D. A continuación, se llevó a cabo el docking molecular mediante el programa Autodock. Los cálculos de acoplamiento se realizaron con AutoDock versión 4.2.6, que realiza un acoplamiento automatizado de los ligandos con flexibilidad diédrica especificada por el usuario dentro de un sitio de unión rígida de COX2. Cada ejecución proporcionó una posición predicha en el modo de acoplamiento en el sitio alostérico de inhibición de COX2. Para los ligandos y la proteína, se asignaron cargas Gasteiger y se adicionaron átomos de hidrógeno. Durante el acoplamiento, se permitió que el ligando realizara todas las torsiones posibles. Cada cuadrícula estaba centrada en las coordenadas cristalográficas del compuesto co cristalizado. Las dimensiones del Grid (mapa de cuadrícula) fueron 60 x 60 x 60 con 0,375 puntos Å de separación. El algoritmo genético lamarckiano se aplicó como parámetro predeterminado. El número de corridas de acoplamiento fue de 100. Después del acoplamiento, todas las soluciones se agruparon en grupos con un RMSD inferior a 2.0. Todas las soluciones se agruparon y clasificaron por el representante de energía ( $\Delta G$ ) más bajo de la puntuación. Discovery Studio versión 3.5 (Accelrys, Inc.) y el software PyMOL versión 2.7 se utilizaron para la visualización 2D y 3D, respectivamente. Todos los protocolos fueron validados a través de un redocking con la molécula cocrystalizada.

## 9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto del control y posteriormente se les aplicó la prueba paramétrica complementaria para comparación de medias de Tukey-Kramer con valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Evaluación *in vivo* e *in vitro*.

#### 10.1.2 Efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular.

En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos de la evaluación del efecto antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en el modelo de edema auricular inducido con TPA. Las orejas que recibieron sólo TPA/vehículo (grupo control) desarrollaron un edema prominente, el cual sirve de referencia y control interno de desarrollo del modelo. Transcurridas 6 horas después de la aplicación del TPA, se obtiene un peso promedio de  $7.8 \pm 0.8$  mg en la muestra auricular. Las orejas tratadas con indometacina mostraron un edema significativamente menor en comparación con el grupo control; su porcentaje de inhibición fue de 55.2%. Los grupos tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol presentaron un porcentaje significativamente mayor que la indometacina, siendo el lupeol el compuesto que genera una mayor inhibición, registrando un 85.3% de inhibición del edema auricular  $p < 0.05$ .

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de  $\alpha$ -amirina y lupeol en edema auricular de ratón inducido por TPA (2.5  $\mu$ g/oreja)

GRUPO	DOSIS	PESO DE LA OREJA (mg)	% DE INHIBICIÓN
Control	-	$7.8 \pm 0.8$	-
$\alpha$ -amirina	1 mg/oreja	$4.8 \pm 0.6$	68.4 *
Lupeol	1 mg/oreja	$4.1 \pm 0.3$	85.3 *
Indometacina	1 mg/oreja	$5.8 \pm 0.9$	55.2 *

Media  $\pm$  D.E. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

\*Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (\* $p < 0.05$ ;  $n=5$ ).

### 10.1.3 Prueba de funcionalidad celular en las células RAW 264.7.

Las células tratadas con  $\alpha$ -amirina y lupeol mantuvieron una funcionalidad mayor al 80% a una concentración de 1  $\mu$ M. En el caso de la concentración de 100  $\mu$ M se presentó un porcentaje de funcionalidad celular mucho menor, el cual osciló el 60%. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en esta prueba, y considerando los antecedentes directos de estos compuestos evaluado en otras entidades celulares, se llegó a la conclusión de que las concentración óptima para tratamientos posteriores será la de 10  $\mu$ M, ya que al ser utilizadas estas concentraciones se mantiene un porcentaje de funcionalidad mayor al 80%, el cual figura en el rango de aceptación de la prueba de funcionalidad celular según la literatura (Kumar et al., 2018).

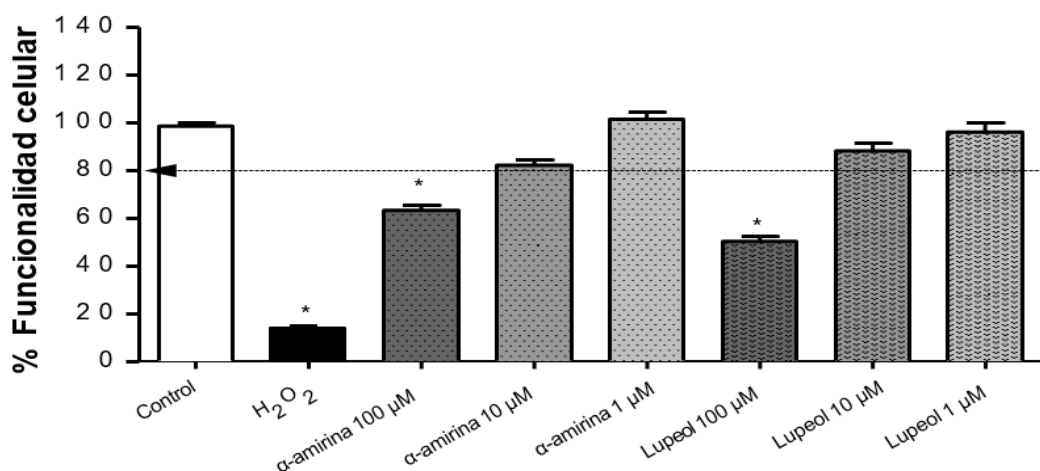


Figura 3. Se muestran los resultados de la prueba de funcionalidad celular en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M.



#### 10.1.4 Expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- $\beta$ e IL-10.

Se cuantificaron los niveles de expresión de las diferentes citocinas en las células RAW 264.7, después de haber sido estimuladas con LPS. Las citocinas proinflamatorias evaluadas fueron TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, mientras que la citocina antiinflamatoria evaluada fue IL-10. El tratamiento con LPS induce una respuesta inflamatoria por parte del macrófago, lo que se traduce en un incremento significativo de diversos mediadores inflamatorios, entre ellos, TNF- $\alpha$ . Esto puede apreciarse en la figura 4, ya que el tratamiento con LPS produce un incremento significativo en los niveles de expresión de dicha citocina. Por su parte el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol, disminuye significativamente la expresión de TNF- $\alpha$  a pesar de ser tratadas con LPS. En el caso de  $\alpha$ -amirina, reduce un 25% los niveles de expresión, mientras que para lupeol se observó un descenso del 50% en los niveles de expresión con respecto al grupo tratado con LPS. Una reducción semejante a la que induce el Celecoxib, un control positivo que permitió tener como referencia el impacto biológico que produce un potente inhibidor selectivo de la COX-2 (Figura 4).

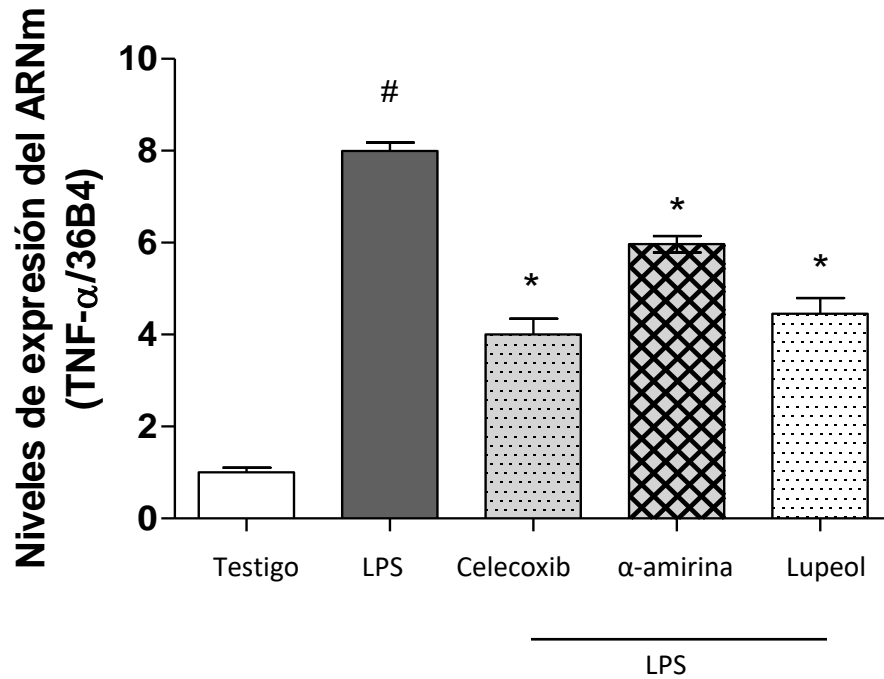


Figura 4. Se muestran los resultados de la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ . (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M.

La IL-6 es producida rápida y transitoriamente en respuesta a infecciones y lesiones tisulares, como ocurre con el estímulo de LPS, se genera una respuesta inflamatoria por parte del macrófago. Esto puede apreciarse en la figura 5, ya que el tratamiento con LPS produce un incremento significativo en los niveles de expresión de dicha citocina. Por su parte el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol, disminuye significativamente la expresión de IL-6 a pesar de ser tratadas con LPS. En el caso de  $\alpha$ -amirina, reduce un 34.10% los niveles de expresión, mientras que para lupeol se observó un descenso del 25.8% en los niveles de expresión con respecto al grupo tratado con LPS (Figura 5).

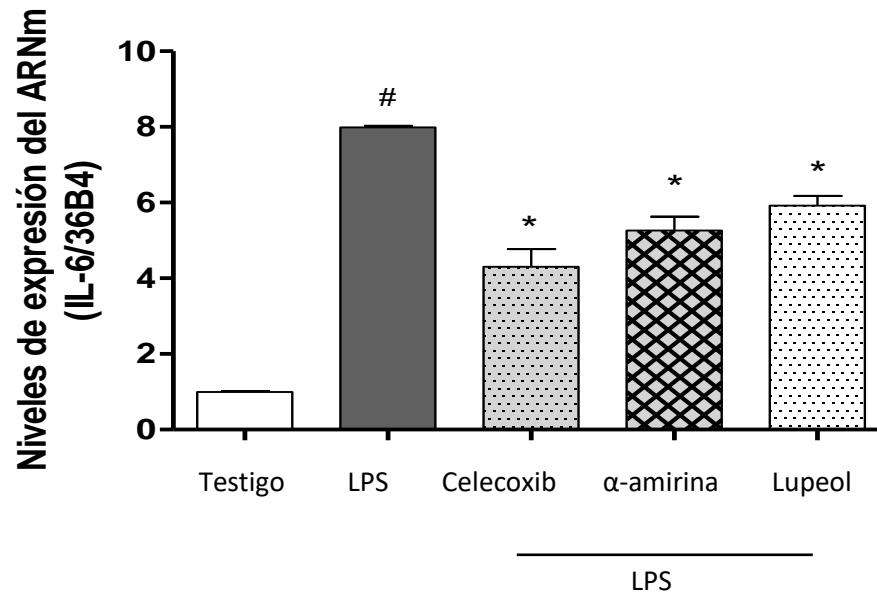


Figura 5. Se muestran los resultados de la expresión del ARNm de IL-6. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M.

La IL-1 $\beta$  se genera una respuesta inflamatoria por parte del macrófago. Esto puede apreciarse en la figura 6, ya que el tratamiento con LPS produce un incremento significativo en los niveles de expresión de dicha citocina. Por su parte el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol, disminuye significativamente la expresión de IL-1 $\beta$  a pesar de ser tratadas con LPS. En el caso de  $\alpha$ -amirina, reduce un 85.4% los niveles de expresión, mientras que para lupeol se observó un descenso del 86.8% en los niveles de expresión con respecto al grupo tratado con LPS (Figura 6).

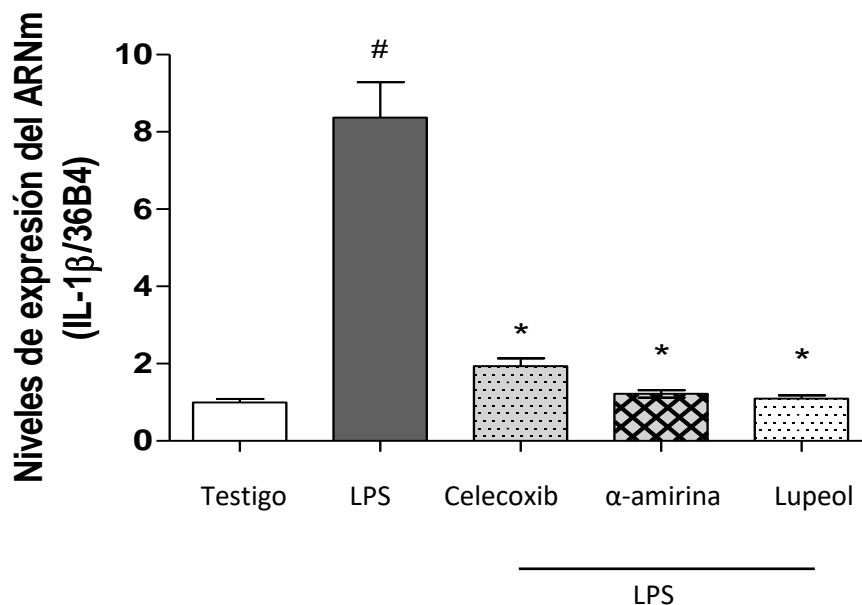


Figura 6. Se muestran los resultados de la expresión del ARNm de IL-1β (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M.

Los macrófagos producen IL-10 con un estímulo de LPS, esto puede apreciarse en la figura 7, ya que el tratamiento con LPS produce un descenso en los niveles de expresión de dicha citocina. Por su parte el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol, aumenta significativamente la expresión de IL-10 a pesar de ser tratadas con LPS. En el caso de  $\alpha$ -amirina aumenta un 54.1% los niveles de expresión, mientras que para lupeol se observó un aumento del 45.9% en los niveles de expresión con respecto al grupo tratado con LPS (Figura 7).

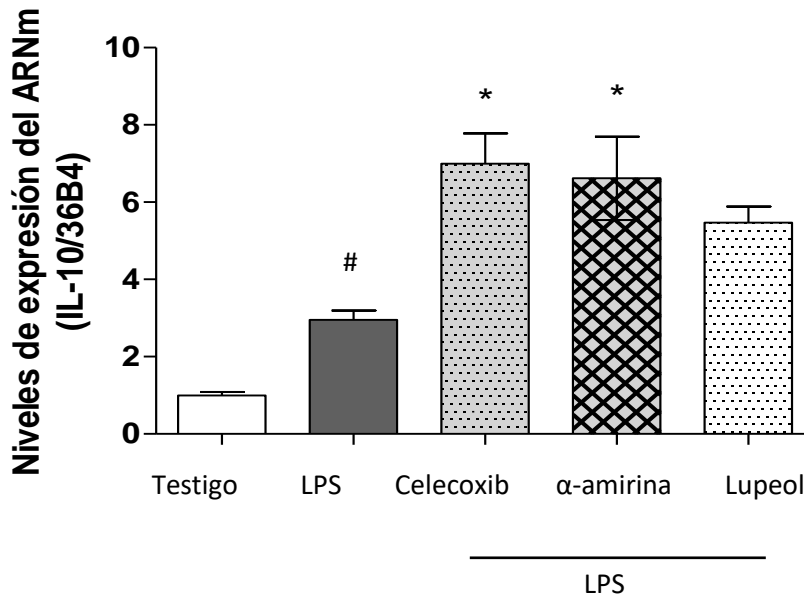


Figura 7. Se muestran los resultados de la expresión del ARNm de IL-10. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M.

#### 10.1.5 Secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y MCP-1

Se cuantificó la secreción de las diferentes citocinas en las células RAW 264.7, 24 h después de haber sido estimuladas con LPS. Las citocinas proinflamatorias fueron TNF- $\alpha$  e IL-6, la citocina antiinflamatoria fue IL-10 y la quimiocina fue MCP-1.

Se observó que TNF- $\alpha$  aumentó un 50% su concentración respecto al grupo testigo en células tratadas con LPS. Mientras que el tratamiento con celecoxib disminuye significativamente la concentración de esta citocina respecto al grupo LPS. Por otro lado, tanto el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol producen un ligero descenso en los niveles de esta citocina respecto al grupo LPS (Figura 8).

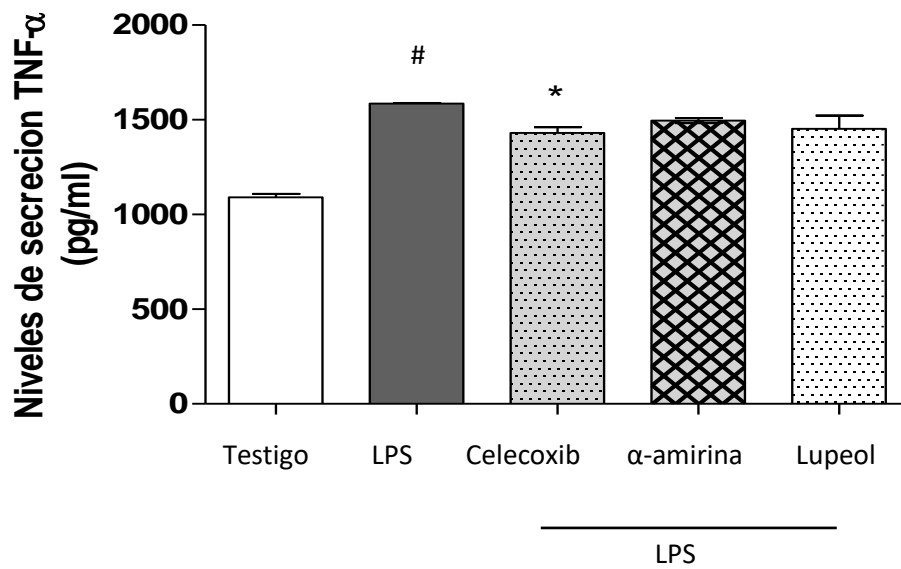


Figura 8. Se muestran los resultados de la secreción de TNF- $\alpha$  (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M

Se observó que IL-6 aumentó un 75% su concentración en células tratadas con LPS respecto al grupo testigo. Mientras que el tratamiento con celecoxib disminuye un 50% la concentración de esta citocina respecto al grupo LPS. Por otro lado, tanto el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol producen un ligero aumento en los niveles de esta citocina respecto al grupo LPS (Figura 9).

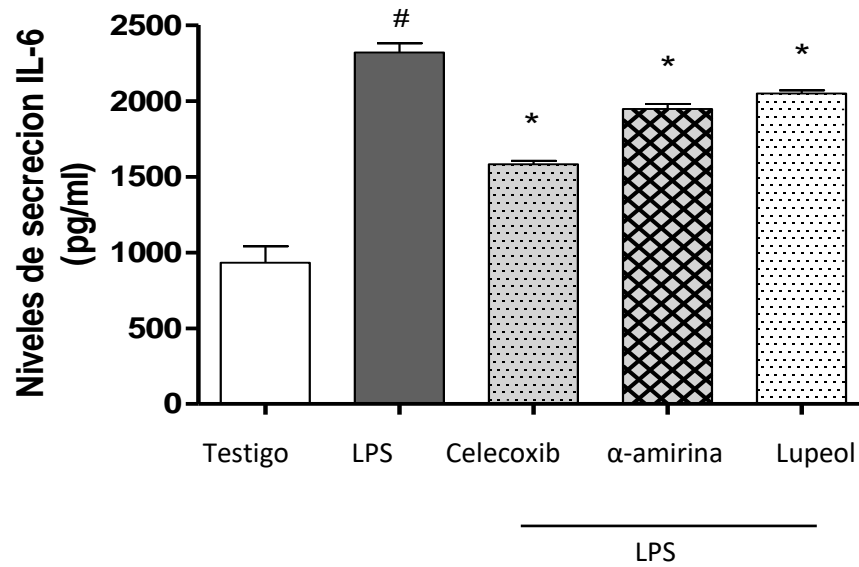


Figura 9. Se muestran los resultados de la secreción de IL-6. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M

Se observó que IL-10 aumentó un 45% su concentración en células tratadas con LPS respecto al grupo testigo. Mientras que el tratamiento con celecoxib aumenta un 95% la concentración de esta citocina respecto al grupo LPS. Por otro lado, tanto el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol producen un ligero aumento en los niveles de esta citocina respecto al grupo testigo, una citocina que tiene un papel antiinflamatorio (Figura 10).

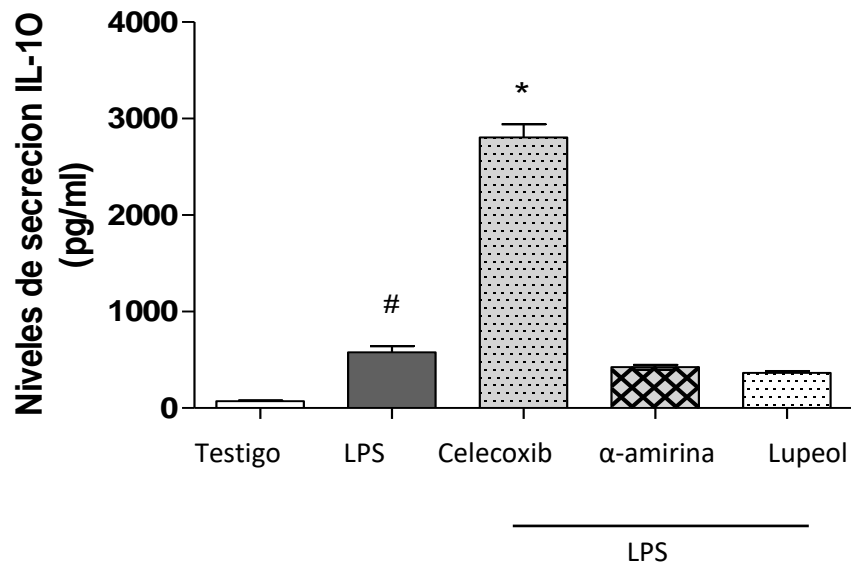


Figura 10. Se muestran los resultados de la secreción de IL-10. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M

Se observó que la MCP-1 aumentó un 40% su concentración en células tratadas con LPS respecto al grupo testigo. Mientras que el tratamiento con celecoxib disminuye significativamente la concentración de esta citocina respecto al grupo LPS. Por otro lado, tanto el tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol producen un descenso significativo en los niveles de esta citocina respecto al grupo LPS, una citocina que tiene un papel inflamatorio quimioatrayente (Figura 11).



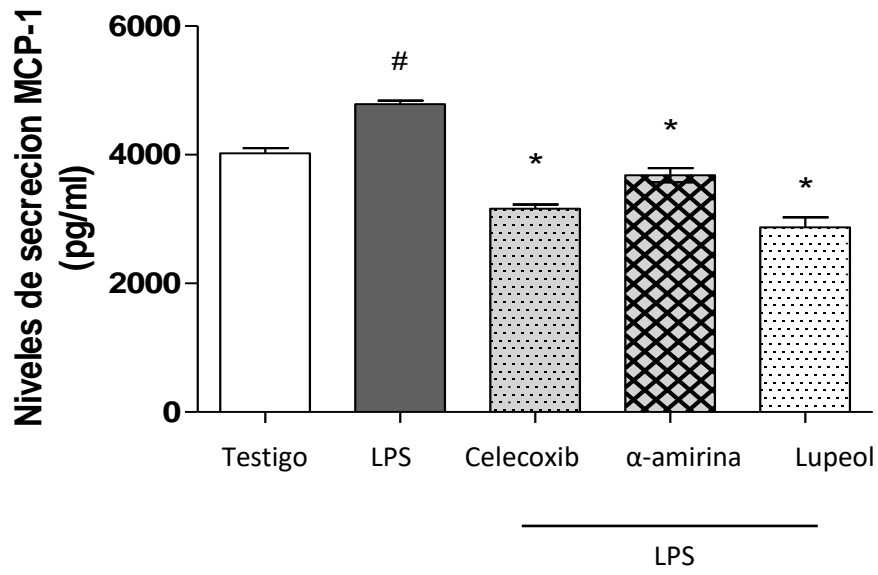


Figura 11. Se muestran los resultados de la secreción de MCP-1. (\*) Diferencia significativa respecto al grupo (LPS). (#) Diferencia significativa respecto al grupo control. ( $p < 0.05$ ). Media  $\pm$  E.E.M

Tabla 3. Determinación de las concentraciones de citocinas

	CONCENTRACIONES EN pg/ml			
	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-10	MCP-1
<b>Control</b>	1091.43 $\pm$ 36.44	932.1 $\pm$ 9.32	70.9767 $\pm$ 20.40	4022.15 $\pm$ 159.97
<b>LPS</b>	1586.65 $\pm$ 6.01	2319.68 $\pm$ 1152.10	579.925 $\pm$ 120.96	4789.65 $\pm$ 110.39
<b>LPS</b>				
<b>CELECOXIB</b>	1430.15 $\pm$ 29.07*	1581.37 $\pm$ 74.99*	2806.58 $\pm$ 417.36*	3162 $\pm$ 133.63*
<b>α-AMIRINA</b>	1496.07 $\pm$ 26.30*	1946.92 $\pm$ 79.20*	423.65 $\pm$ 48.00*	3682.32 $\pm$ 223.08*
<b>LUPEOL</b>	1452.4 $\pm$ 140.71*	2049.6 $\pm$ 63.81*	366.283 $\pm$ 37.01*	2871.2 $\pm$ 313.27*

Media  $\pm$  D.E. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el grupo de LPS (\* $p < 0.05$ ; n = 6).

### 10.1.6 Acoplamiento molecular.

El análisis de acoplamiento molecular revela la interacción y el modo de unión de celecoxib,  $\alpha$ -amirina y lupeol con la subunidad alostérica inhibitoria de la enzima COX-2.

Celecoxib exhibió una afinidad de  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol e interacciones polares por puentes de hidrógeno con residuos SER354, PHE519, ARG514, GLN193 (líneas punteadas amarillas) (Figura 12 y 13).

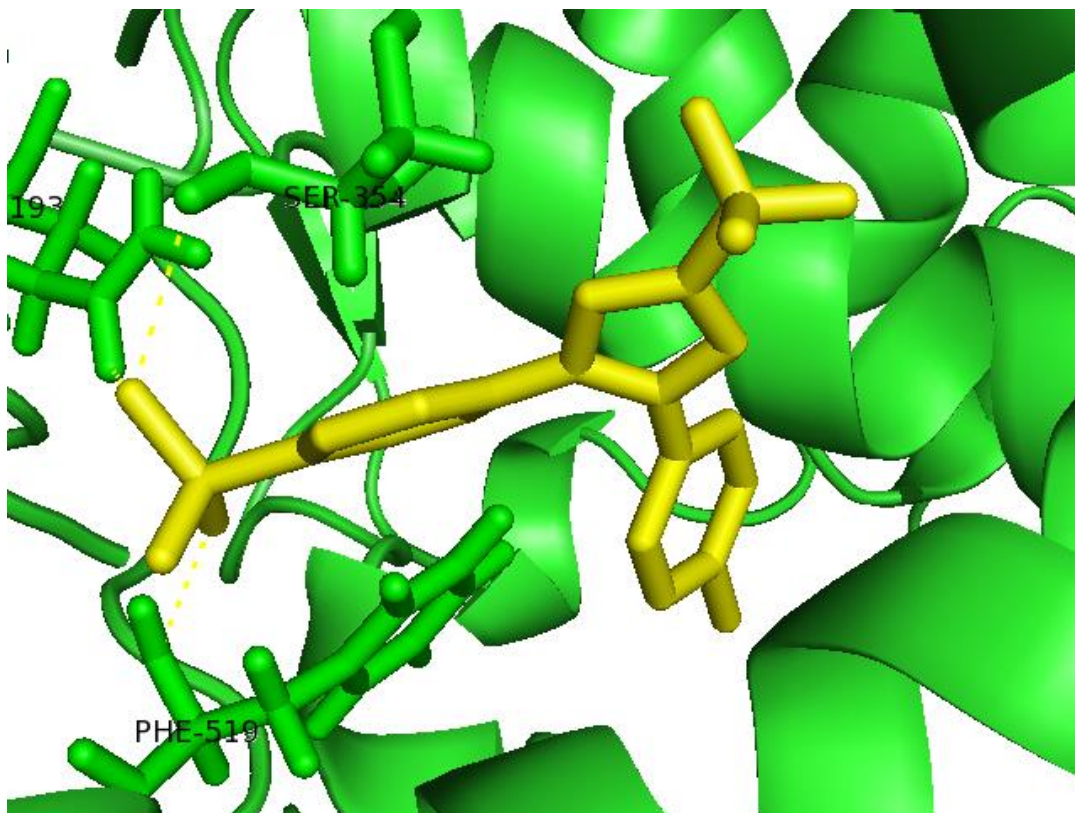


Figura 12. Imagen 3D del acoplamiento del Celecoxib en sitio alostérico de COX-2. Celecoxib en amarillo, COX-2 en verde.  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol (100/100 conformaciones)

El análisis de acoplamiento molecular revela la interacción y el modo de unión de celecoxib con la subunidad alostérica de la enzima COX-2, donde se muestran interacciones no polares de tipo van de Waals en los residuos ARG121, TYR356,

ILE518, ALA517, SER531, PHE382, LEU385, GLY527 y MET523, interacciones pi-Sigma con los residuos LEU360, VAL117, VAL350, VAL524 y LEU353, interacciones Alkyl con los residuos LEU532 y ALA528, interacción pi-Alkyl en los residuos TRP388 y TYR386, interacción carbono-hidrogeno en el residuo HIS90 (Figura 13).

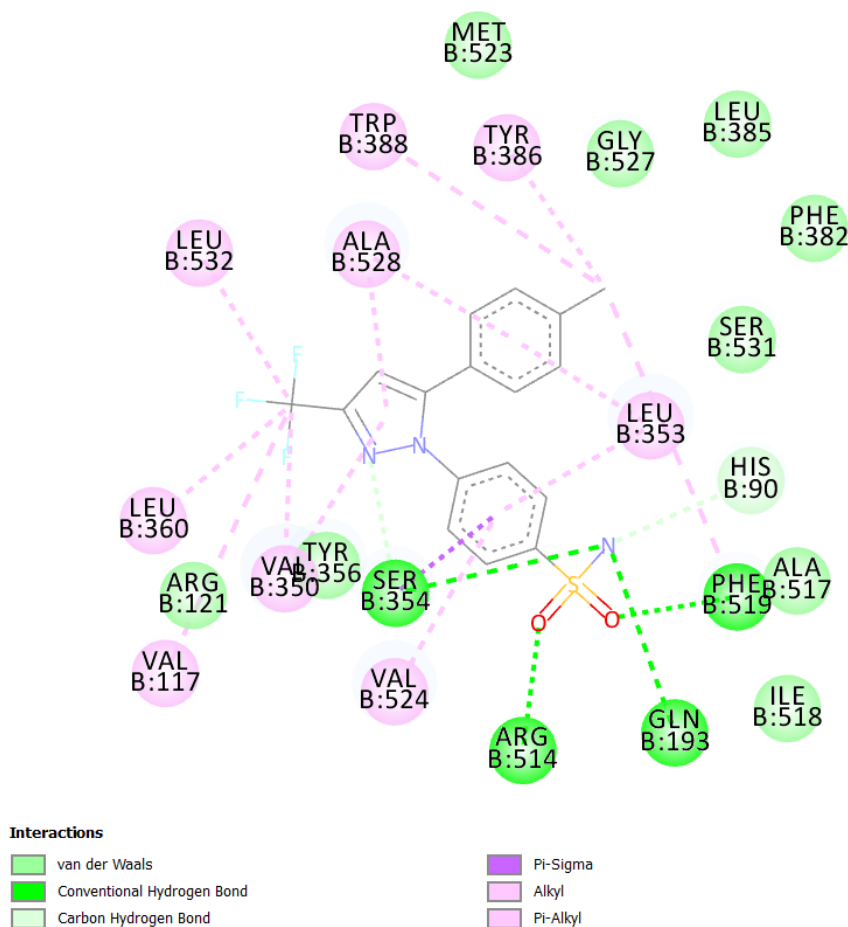


Figura 13. Imagen 2D del acoplamiento del Celecoxib en el sitio alostérico de COX-2.  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol (100/100 conformaciones)

El análisis de acoplamiento molecular revela la interacción molecular y el modo de unión de lupeol (rojo) con la subunidad alostérica de la enzima COX2 (verde). Lupeol exhibió una afinidad de  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol, además se visualizan los

residuos de aminoácidos con los que interactúa el celecoxib (SER354, PHE519, ARG514, GLN193) (Figura 14).

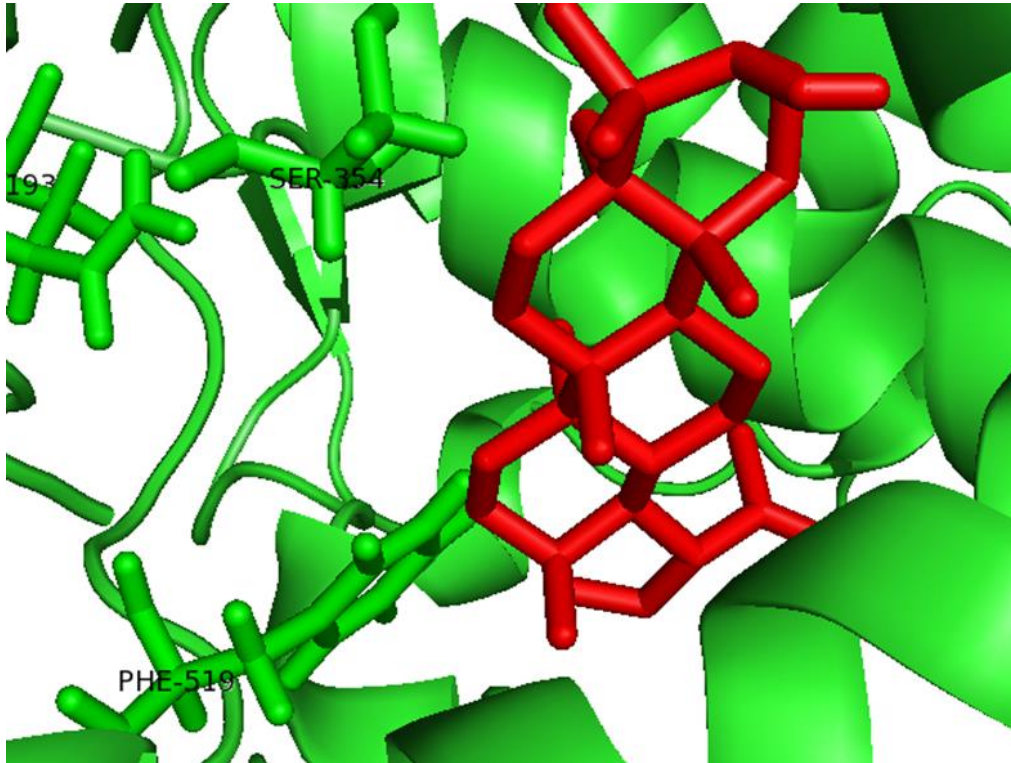


Figura 14. Imagen 3D del acoplamiento de Lupeol en sitio alostérico de COX-2. Lupeol en rojo, COX-2 en verde.  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol (43/100 conformaciones).

Lupeol tuvo interacciones en los residuos ASN582, HIS352, GLN193, GLY355, SER354, ALA517, HIS90, ARG514, PRO515, THR94, HIS357, ASP516 a través de interacciones de tipo van der Waals (Figura 15).

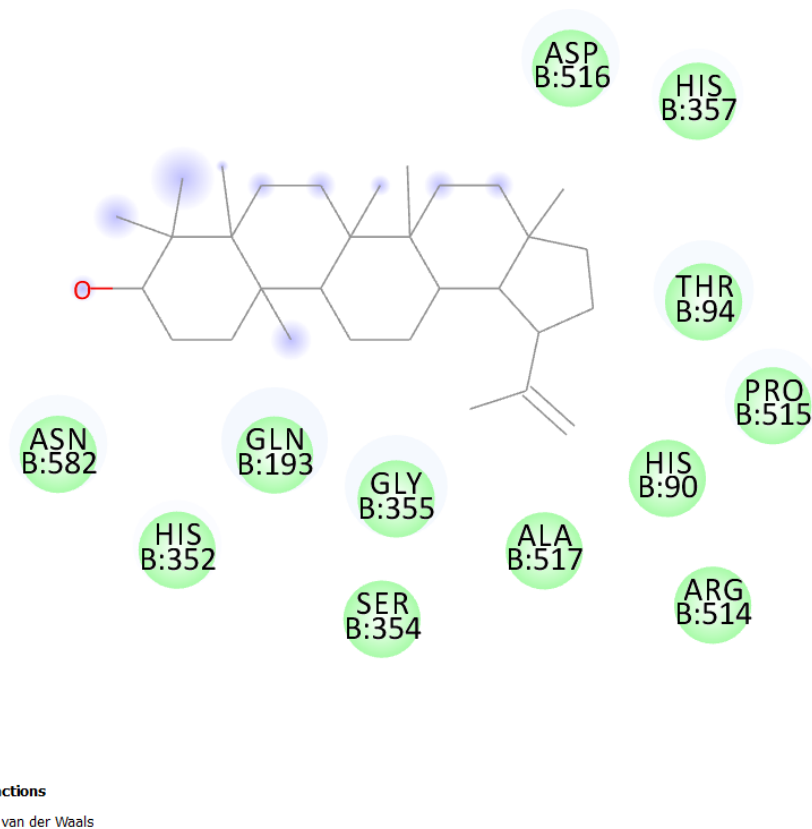


Figura 15. Imagen 2D del acoplamiento del Lupeol en el sitio de unión alostérico de la enzima COX-2.  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol (43/100 conformaciones).

El análisis de acoplamiento molecular revela la interacción molecular y el modo de unión de  $\alpha$ -amirina (azul) en la subunidad alostérica de la enzima COX-2. En rojo se observa al lupeol, en amarillo al celecoxib.  $\alpha$ -amirina exhibió una afinidad de  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol, además se visualizan las interacciones polares por puentes de hidrógeno con residuos SER354, PHE519, GLN193 (líneas punteadas amarillas) que tiene el celecoxib (Figura 16).

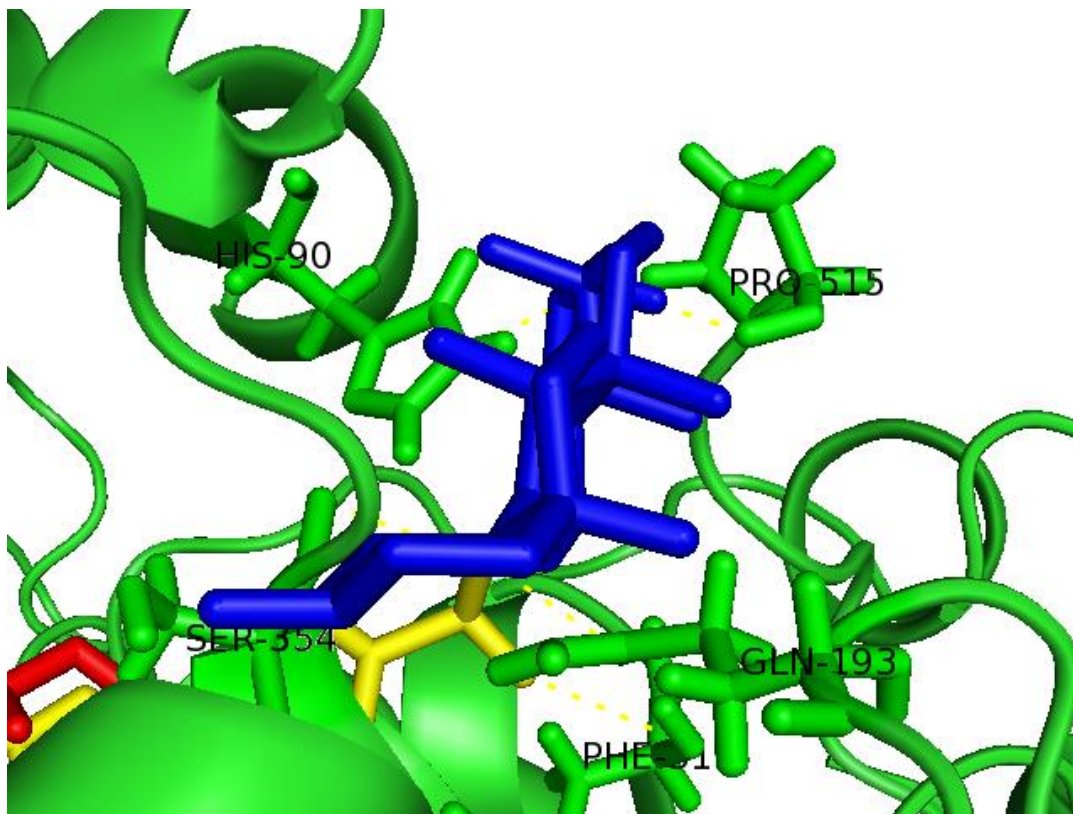


Figura 16. Imagen 3D del acoplamiento de  $\alpha$ -amirina en sitio alostérico de COX-2.  $\alpha$ -amirina en azul, COX-2 en verde.  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol (21/100 conformaciones)

$\alpha$ -amirina tuvo interacciones a través de enlaces no polares van der Waals en los residuos ASN582, GLN351, HIS352, GLN193, GLY355, SER354, ASP516, HIS90, ARG514, THR94 y un enlace no polar alkil ALA517. Además de un enlace polar a través de un puente de hidrogeno con el residuo PRO515 (Figura 17).

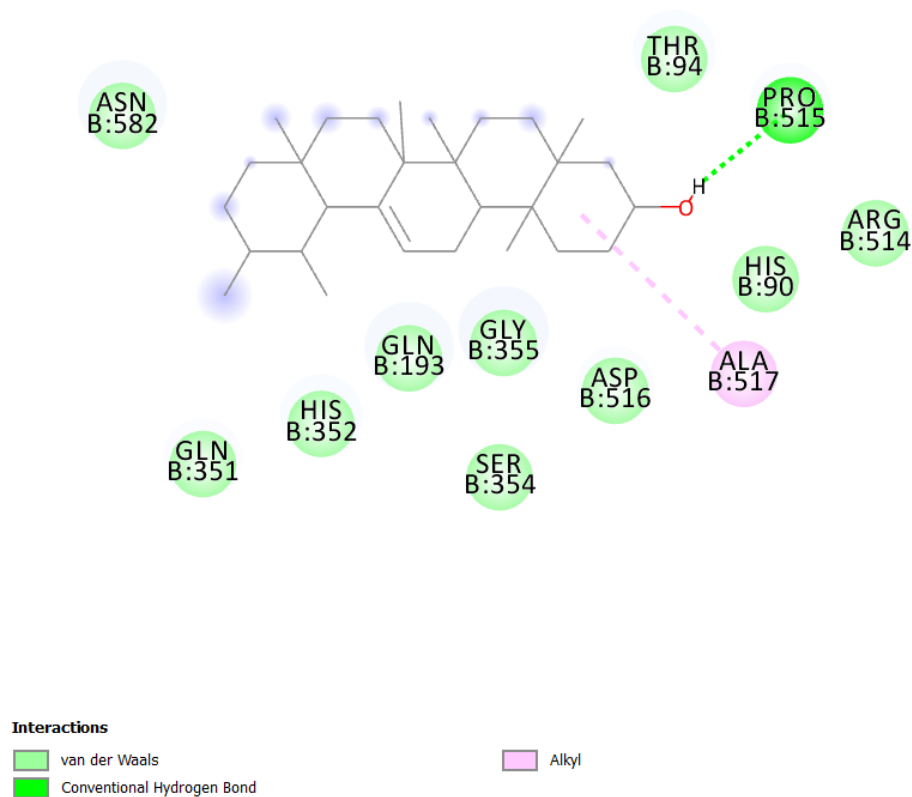


Figura 17. Imagen 2D del acoplamiento del  $\alpha$ -amirina en el sitio de unión alostérico de la enzima COX-2.  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol (21/100 conformaciones)

La figura 18 muestra la sobreposición de lupeol (rojo) y celecoxib (amarillo) en el sitio alostérico de inhibición de COX-2 (verde), el análisis de acoplamiento molecular revela la interacción molecular además del modo de unión de lupeol y celecoxib con la subunidad alostérica de la enzima COX-2. Celecoxib exhibió una afinidad de  $\Delta G = -10.71$  Kcal/mol, lupeol exhibió una afinidad de  $\Delta G = -6.67$  Kcal/mol y  $\alpha$ -amirina exhibió una afinidad de  $\Delta G = -8.43$  Kcal/mol. Además, se visualizan las interacciones polares por puentes de hidrógeno con residuos SER354, PHE519, GLN193 (líneas punteadas amarillas) que tiene el celecoxib (Figura 18).

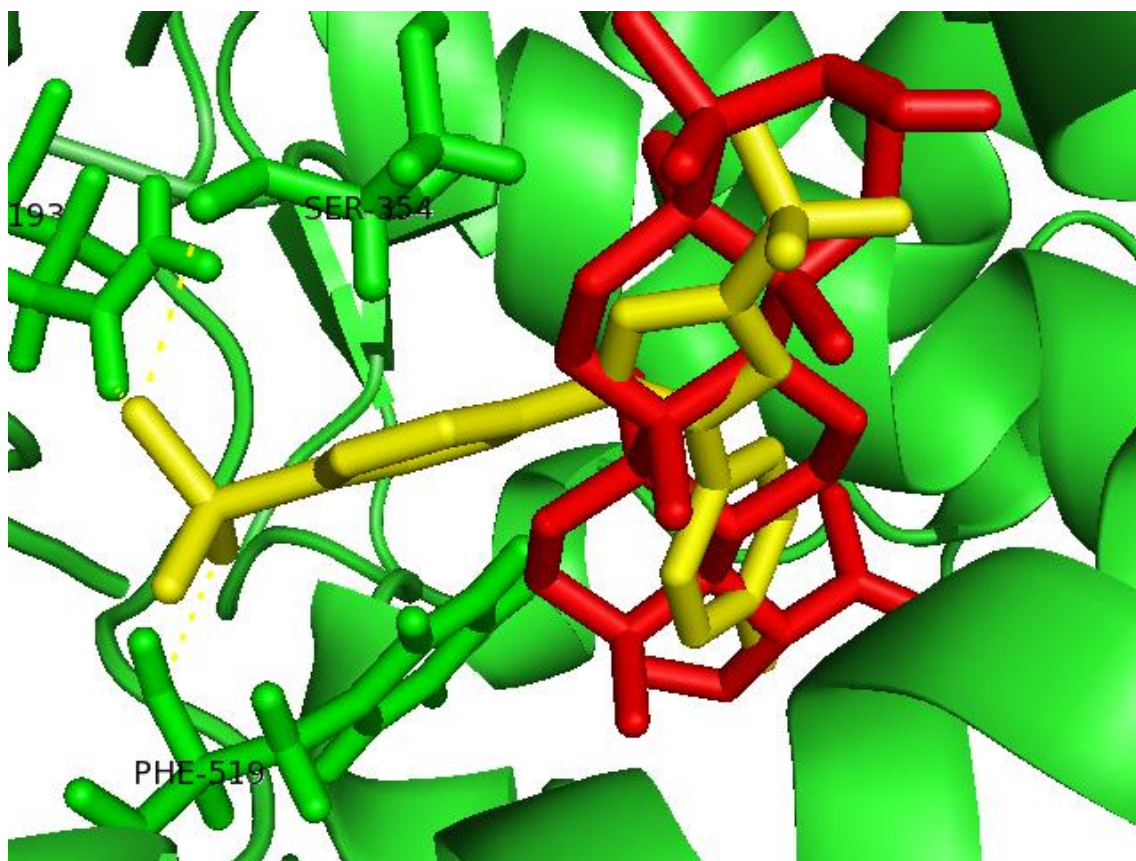


Figura 18. Imagen 3D del acoplamiento de Lupeol y celecoxib en sitio alostérico de COX-2. Lupeol en rojo, celecoxib en amarillo y COX-2 en verde.

Tabla 4. Resumen del acoplamiento molecular

ESTRUCTURA	FUERZA DE UNION $\Delta G$ (KCAL/MOL)	SITIO ALOSTERICODE DE LA COX-2 (CONFORMACIONES)	INTERACCIONES	RESIDUOS DE AMINOACIDOS
LUPEOL	- 6.67	SIMILIAR AL CELECOXIB 43/100	VAN DER WAALS	ASN582, HIS352, GLN193, GLY355, SER354, ALA517, HIS90, ARG514, PRO515, THR94, HIS357, ASP516
$\alpha$ -AMIRINA	- 8.43	A LA PERIFERIA 21/100	VAN DER WAALS	ASN582, GLN351, HIS352, GLN193, GLY355, SER354, ASP516, HIS90, ARG514, THR94
CELECOXIB (CONTROL POSITIVO)	- 10.71	100/100	VAN DER WAALS	ARG121, TYR356, ILE518, ALA517, SER531, PHE382, LEU385, GLY527, MET523



## 11 DISCUSION

La inflamación es una de las respuestas corporales más importantes proporcionadas por el sistema inmunológico, ya que asegura la supervivencia del organismo cuando los tejidos se ven afectados por lesiones o infecciones. La creciente incidencia de obesidad y el síndrome metabólico es inquietante, pues en estas condiciones hay una mayor activación de la inflamación, pues las vías inflamatorias utilizadas normalmente como defensa del huésped, se desregulan aumentando la gravedad de estas afecciones. Entre las principales vías inflamatorias que se activan y se desregulan en condición de síndrome metabólico son las vías de NF- $\kappa$ B y COX-2 (Roe, 2021). En la presente tesis, los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol presentaron efecto antiinflamatorio en el modelo murino inducido por TPA y en el modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7

En la literatura se enfatiza que la inflamación es un blanco de regulación por PPAR, que puede ocurrir a través de mecanismos directos e indirectos (Michalik & Wahli, 2008) se ha demostrado que PPAR $\gamma$  reduce la activación de NF- $\kappa$ B e inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T y la inducción de moléculas reguladoras antiinflamatorias del sistema inmune innato (W. Huang & Glass, 2010). Esto es congruente con los resultados observados en nuestro cultivo de macrófagos RAW 264.7 puesto que las concentraciones de las citocinas bajaron al aplicarles los tratamientos con los compuestos  $\alpha$ -amirina y lupeol.

Las citocinas son mediadores críticos que supervisan y regulan las respuestas inmunes e inflamatorias a través de redes complejas, y sirven como biomarcadores para enfermedades como la artritis y la enfermedad inflamatoria intestinal (C. Liu et al., 2021). Las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, además de la quimiocina MCP-1 son iniciadoras importantes de la respuesta inflamatoria; así mismo, participan en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias, estimulando la producción de NO y PGE2 en la lesión tisular, y contribuyendo al fallo múltiple de órganos. La IL-10 tiene importantes efectos reguladores sobre la respuesta inflamatoria, debido a su capacidad para mitigar la expresión de MHC-II y para inhibir la producción de

citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Sprague & Khalil, 2009). Por lo que, el efecto observado en cuanto a la expresión de citocinas muestra que lupeol y  $\alpha$ -amirina actúan a este nivel.

Las quimiocinas constituyen una familia de citocinas quimioatrayentes. Las quimiocinas desempeñan un papel importante en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como en la inducción de quimiotaxis a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G. La MCP-1 es una de las quimiocinas clave que regulan la migración e infiltración de monocitos y macrófagos. La migración de monocitos desde el torrente sanguíneo a través del endotelio vascular es necesaria para la vigilancia inmunológica de rutina de los tejidos, así como en respuesta a la inflamación (Deshmane et al., 2009).

Entre las moléculas inflamatorias reguladas al alza en el tejido adiposo, bajo condiciones de obesidad, MCP-1 ha sido visto como una de las quimiocinas candidatas que inician la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo e inducen resistencia sistémica a la insulina (Kamei et al., 2006). Además, el aumento de la expresión de esta quimiocina en el tejido adiposo precede a la expresión de otros marcadores de macrófagos durante el desarrollo del síndrome metabólico (Kanda et al., 2006).

Dirigirse a NF- $\kappa$ B o a la COX-2 es un enfoque terapéutico atractivo porque se ha observado una señalización aberrante de estas vías en todos los tipos de enfermedades inflamatorias y sobre todo en el cuadro del síndrome metabólico. Se ha reportado una amplia variedad de moduladores de moléculas que funcionan para inhibir NF- $\kappa$ B y la COX-2 dirigiéndose a diferentes puntos en las vías de señalización. Estos compuestos son sintéticos y derivados de plantas medicinales que exhiben actividad antagonista NF- $\kappa$ B o COX-2 y se evalúa su eficacia en un cultivo de células tumorales, modelos *in vivo* e *in silico* con la esperanza de identificar compuestos de valor terapéutico (Harrold et al., 2020).

Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* de los triterpenos  $\alpha$ -amirina y

lupeol, dos compuestos identificados en *Hibiscus sabdariffa* que han sido caracterizados como agonistas de PPAR $\delta$ / $\gamma$ .

En el caso del modelo de macrófagos RAW 264.7 en cultivo estimulados con LPS (modelo *in vitro*), primero se realizó el ensayo MTT para determinar el potencial efecto citotóxico de los compuestos. En esta prueba se utilizó como base la sal mono-tetrazolio, también llamada MTT o metil-tiazolil-tetrazolio (Ghasemi et al., 2021). Se trata de un ensayo colorimétrico utilizado en estudios de actividad metabólica celular. Este ensayo permite evaluar la viabilidad celular en términos de actividad reductora por deshidrogenasas, la conversión enzimática del compuesto de tetrazolio en cristales de formazán insolubles en agua, que se producen en las mitocondrias de las células vivas, aunque también están involucrados agentes reductores y enzimas ubicadas en otros organelos como el retículo endoplásmico. Sin embargo, la mayor aportación enzimática la hacen las mitocondrias funcionales. La concentración de formazán es directamente proporcional al número de células vivas, por lo que es utilizado como un marcador de viabilidad celular (van Tonder et al., 2015). Las concentraciones seleccionadas de los compuestos para continuar los estudios con los macrófagos fueron de 10  $\mu$ M, ya que no produjeron cambios significativos con respecto al control y presentaron una viabilidad celular superior al 80%, además de ser concentraciones a las que se han evaluado estos triterpenos en otras líneas celulares (Fernández et al., 2010). Hasta el momento, no se han reportado las concentraciones de  $\alpha$ -amirina en el ensayo de MTT en macrófagos RAW 264.7, sin embargo la concentración de 10  $\mu$ M ha sido utilizada en macrófagos murinos peritoneales con una viabilidad celular de 100% (Arana-Argáez et al., 2017). La concentración de los triterpenos a 10  $\mu$ M no afectó significativamente la reducción mitocondrial. En el ensayo de MTT, no mostró ningún efecto sobre la funcionalidad celular.

Para determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los triterpenos  $\alpha$ -amirina y lupeol, se utilizó el modelo de edema auricular inducido por TPA.

El TPA, cuando se aplica a la piel, causa un efecto irritante rápido y potente al activar la vía de la PKC, lo que resulta en niveles elevados de eicosanoides como la PGE2

y LTB<sub>4</sub>. Además, promueve la activación de la vía MAPK, que induce la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$ , IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófago 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ). Las moléculas de adhesión y las enzimas se activan, lo que resulta en la formación de edema y la migración de leucocitos a la dermis (Boller et al., 2010).

Mediante este ensayo se logró apreciar que lupeol presentó mayor actividad antiinflamatoria, con un porcentaje de inhibición del 85.3% con respecto al grupo control. Estos datos concuerdan con los reportados por Fernández *et al*, ya que demostraron que un extracto rico en lupeol de la planta *Pimenta racemosa* (ampliamente utilizado por los médicos del país en la región del Caribe para tratar dolencias inflamatorias) exhibe una actividad antiinflamatoria significativa en modelos *in vivo*, además mostró que el efecto antiinflamatorio del extracto rico en lupeol inhibió en un 78.5% la generación del edema, incluso, mostró una inhibición selectiva sobre la COX, incluso superior a la generada por la indometacina, un fármaco de referencia que posee potente efecto antiinflamatorio en la práctica clínica (Fernández et al., 2001).

Otro estudio reportado por Fernández et al., mencionan que el lupeol disminuye la secreción de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  y PGE<sub>2</sub> en macrófagos peritoneales estimulados con LPS (Fernández et al., 2010). Nuestros resultados mostraron en cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 que además de reducir la producción de las citocinas previamente mencionadas, el lupeol reduce significativamente la IL-6. Este resultado podría reflejar una potencial atenuación del proceso inflamatorio, ya que el descenso de IL-6 se asocia con una baja concentración de MCP-1, que se sabe que es una proteína quimioatrayente de macrófagos, que puede contribuir a la agravación del problema inflamatorio. Ambos eventos, se podrían asociar a la posible inhibición de NF- $\kappa$ B (Mirza et al., 2019). Sin embargo, está bien establecido que la inflamación inducida por TPA está relacionada con la activación de la PKC que estimula la actividad de la COX-2 y la generación de metabolitos implicados en la permeabilidad vascular en este modelo, lo que indica que el lupeol también podría

estar funcionando como un inhibidor selectivo de la COX-2 o reduciendo la actividad de la PKC.

Por otro lado,  $\alpha$ -amirina también ejerció un potente efecto antiinflamatorio, ya que inhibió el edema inducido por TPA en un 68.4%, aunque fue un porcentaje de inhibición menor al que produjo lupeol,  $\alpha$ -amirina mostró mayor efectividad que la indometacina. Los estudios reportados por Medeiros et. al., sugieren que la aplicación tópica en la piel de  $\alpha$ -amirina aislado de *Protium Kleinii* ejerce una inhibición fuerte y rápida de la inflamación inducida por TPA en ratones suizos machos. Estos efectos parecen estar asociados con la supresión de los niveles de PGE2 en la piel, por mecanismos que implican la supresión de la expresión de COX-2 y prevención la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , la fosforilación de p65/RelA y la activación de NF- $\kappa$ B (Medeiros et al., 2007). La PGE2 es uno de los mediadores lipídicos más típicos producidos a partir del AA por la COX y actúa sobre cuatro subtipos de receptores (EP1-EP4) para provocar sus diversas acciones, incluyendo pirexia, sensación de dolor e inflamación. Los receptores de prostaglandinas EP1-EP4 son receptores acoplados a proteína G, las rutas de señalización que regulan, incluyen la Adenilato ciclasa, que cuando se activa aumenta los niveles celulares de AMPc; PLC que cuando se activa es responsable de formar segundos mensajeros de trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol que son responsables de elevar los niveles de Ca<sup>2+</sup> en el citosol para controlar la actividad de PKC; y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), proteína cinasas activadas por mitógenos p38 y proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) que cuando se activan, influyen en la expresión de NF- $\kappa$ B, COX-2 y proteínas relacionadas al ciclo celular (Kawahara et al., 2015). Al inhibir directamente a la COX-2, la síntesis de PGE2 se ve interrumpida, así ya no se estaría dando la transducción de señales que active a las proteínas que regulan la inflamación y el ciclo celular. Nuestros resultados apoyan datos de *Medeiros et. al.*, ya que logramos observar una reducción importante en citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .  $\alpha$ -amirina podría estar ejerciendo su efecto antiinflamatorio a través de la inhibición de COX-2 y además por una disminución de la proliferación celular. La disminución del edema ocasionado por la  $\alpha$ -amirina sugiere realizar más investigaciones en el tejido del

edema para examinar cambios morfológicos, fragmentación del ADN, perturbación del ciclo celular y activación de caspasas, con la posibilidad de un potencial fármaco antitumoral.

Las citocinas iniciales en la cascada de inflamación, principalmente de NF- $\kappa$ B y COX-2, en orden de activación, son: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Estas citocinas funcionan en una red y sus niveles se intercorrelacionan. En los modelos *in vitro* lo que se quiere determinar es como afectan los niveles de expresión de estas citocinas, es por eso por lo que se cuantificó la expresión relativa de estas citocinas después de estimular a los macrófagos RAW 264.7 con LPS, y ser tratadas con  $\alpha$ -amirina y lupeol. Los tratamientos redujeron la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  al mismo tiempo que aumentaron la expresión de IL-10 en comparación con el grupo tratado solamente con LPS. En la secreción de las citocinas no hubo diferencias significativas con respecto a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sin embargo, se logra apreciar una disminución significativa de las concentraciones MCP-1 e IL-6, lo que estaría indicando una posible regulación y mejora del proceso inflamatorio. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  estimulan la producción de IL-6, que se ha clasificado como una citocina proinflamatoria y antiinflamatoria. IL-10 actúa como una molécula antiinflamatoria ya que muestra una inhibición de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  así como la producción de quimiocinas, incluida MCP-1 (Petersen & Pedersen, 2005). Tal vez, por esta razón, no se encontró un aumento significativo de IL-6 porque los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fueron los suficientes, ya que su incremento fue inhibido por la IL-10. Los macrófagos son una fuente importante de IL-10, esta citocina juega un papel esencial en el control de la inflamación y la instrucción de respuestas inmunes, es la clave para limitar la respuesta inflamatoria, los resultados de la expresión génica nos indican que los triterpenos regulan positivamente los niveles de IL-10 parecidos a celecoxib, esta podría ser la razón que se observe una disminución del proceso inflamatorio tal y como se ha reportado en varios estudios, donde IL-10 regula negativamente la expresión de citocinas inflamatorias

COX-2 es una enzima crítica en muchos procesos fisiológicos y patológicos, además es un sistema enzimático importante en la cascada de reacciones

inflamatorias. Tiene un papel central en las infecciones virales y bacterianas regulando los niveles de expresión de muchas proteínas séricas (L. Liu et al., 2011). Esta enzima tiene un gran efecto sobre las citocinas proinflamatorias. La inhibición farmacológica de COX-2 por celecoxib disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 por una regulación a la baja de NF- $\kappa$ B (Baghaki et al., 2020).

En la búsqueda para dilucidar el mecanismo de acción que pudieran tener estos dos triterpenos se evaluó en un modelo *in silico* el acoplamiento con un sitio alostérico de inhibición de COX-2. Se conoce que la actividad de esta enzima se encuentra ligada con la vía de NF- $\kappa$ B por los receptores de prostaglandinas (EP2). La PGE2 activa a su receptor EP2 y este receptor desencadena la vía de señalización, que a su vez activa a NF- $\kappa$ B, por lo que este factor de transcripción aumenta las citocinas inflamatorias y que sirven como potencializadores de la expresión de COX-2, volviéndose una retroalimentación positiva (Aoki et al., 2017).

Ya que en el modelo de TPA,  $\alpha$ -amirina y lupeol disminuyeron la inflamación y además la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, COX-2 podría estar involucrada. El estudio de acoplamiento molecular muestra que  $\alpha$ -amirina se une en la periferia del sitio alostérico comparado con el sitio donde se une el celecoxib. Por otra parte, el lupeol se une de manera semejante que el celecoxib, sin embargo, no muestra uniones mediante puentes de hidrógeno, mostrando una posible posición inhibitoria diferente, ya que disminuye la expresión de las citocinas proinflamatorias (Figura 14, 16 y 18).

El análisis de docking molecular muestra que estos triterpenos no se unen de manera similar a celecoxib, sin embargo, estos tipos de unión podrían ser adecuados o suficientes para disminuir las citocinas proinflamatorias, tal y como se muestra en las figuras 4, 5, 6 y 7.

En el estudio *in silico*, lupeol se une muy parecido al celecoxib, aunque las  $\Delta G$  son diferentes (- 6.67 Kcal/mol y -10.71 Kcal/mol, respectivamente) y no se une a través de los puentes de hidrogeno que muestra este AINE, las interacciones que tiene en los residuos ASN582, HIS352, GLN193, GLY355, SER354, ALA517, HIS90, ARG514, PRO515, THR94, HIS357, ASP516 a través de enlaces de van der Waals

podría ser más efectiva (Figura 15). Esta otra posición y tipos de uniones indica que posiblemente este actuando también de manera inhibitoria, debido a lo que observamos en los resultados de la inflamación por TPA, en la disminución de la expresión y el ensayo de ELISA de las citocinas proinflamatorias. Los resultados *in vivo* muestran que la disminución del edema en el modelo de TPA, estaría indicando que está teniendo una buena inhibición de la COX-2, lo cual se asocia con el estudio *in silico*. Por otra parte, posiblemente podría actuar inhibiendo NF- $\kappa$ B, lo que se relacionaría con una regularización de PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  a la baja, lo que quiere decir que hay una importante atenuación de la inflamación, por los que estudios posteriores sobre la vía NF- $\kappa$ B deben ser explorados. Es importante destacar que el lupeol, mostró una disminución mayor de citocinas comparado con celecoxib en el modelo *in vitro*, sugiriendo una posible unión más adecuada que el propio celecoxib, que podría estar llevando a cabo un cambio conformacional inhibitorio de COX-2 más efectivo y se relaciona con la disminución de MCP-1, en conjunto, estos datos indican que lupeol podría estar ejerciendo su mecanismo de acción al inhibir el reclutamiento de más células al inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos que favorecen el proceso inflamatorio.

Dentro del estudio *in silico*,  $\alpha$ -amirina muestra que se une en la periferia del sitio inhibitorio alostérico de COX-2, por lo cual creemos que su mecanismo de acción antiinflamatorio no es a través de COX-2, sugiriendo otro mecanismo de acción que aún queda por elucidar. Hipotetizamos que el lupeol este ejerciendo su efecto antiinflamatorio a través de la inhibición de COX-2 y  $\alpha$ -amirina pueda estar actuando a otro nivel aún desconocido, sin descartar que se encuentren involucrados con la atenuación de la actividad de COX-2 y NF- $\kappa$ B, además de una clara reducción de los mediadores inflamatorios como lo son las citocinas antiinflamatorias y el aumento de IL-10.

Los estudios *in vivo*, *in vitro* e *in silico* por  $\alpha$ -amirina y el lupeol nos brindan información importante acerca del mecanismo de acción y de los efectos sinérgicos que tienen estos compuestos; no solo una importante inhibición de la inflamación en el modelo de TPA, sino que también una gran posibilidad de inhibición de las dos



vías más importantes de la inflamación, COX-2 y NF- $\kappa$ B, siendo lupeol el que tiene mayor efecto en el modelo *in vivo* mostrado en el ensayo de generación del edema por TPA, que su efecto es incluso mayor a la indometacina. Esto finalmente se asocia directamente con la disminución de la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias por este último, además de una unión muy semejante a celecoxib en la subunidad alostérica de COX-2.

Encontramos que  $\alpha$ -amirina y lupeol previenen la inflamación local aguda causada por el TPA en ratones. El efecto de lupeol parece ser el resultado de inhibir la COX-2 como lo muestra el estudio de docking molecular, por otra parte, queda por evaluar ambos triterpenos y la posible inhibición de NF- $\kappa$ B. Aunado a estos resultados,  $\alpha$ -amirina y lupeol como agonistas de PPAR $\delta/\gamma$  podrían contribuir a los efectos antiinflamatorios después de una estimulación con LPS a macrófagos RAW 264.7.

Nuestros hallazgos del estudio sugieren que  $\alpha$ -amirina y lupeol son moléculas candidatas en el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de enfermedades que cursen procesos inflamatorios, como la diabetes, hipertensión, obesidad, enfermedades cardiovasculares, cancer, entre otras.

Es necesario conducir hacia futuras investigaciones el efecto de dichos triterpenos para que sean considerados como candidatos prometedores al desarrollo de inhibidores selectivos de NF- $\kappa$ B y COX-2.

## 12 CONCLUSIONES

1. La administración de  $\alpha$ -amirina y lupeol disminuyen significativamente el desarrollo del edema provocado por el TPA.
2. El tratamiento con  $\alpha$ -amirina y lupeol disminuyen significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias y aumentan la expresión de citocinas antiinflamatorias.
3.  $\alpha$ -amirina y lupeol provocan un descenso significativo en la producción de MCP-1 de macrófagos en cultivo.
4. El análisis de acoplamiento molecular reveló que lupeol interactúa con aminoácidos característicos del sitio alostérico de COX-2, mientras que  $\alpha$ -amirina mostró una interacción diferente a la que ejercen los AINES convencionales.
5.  $\alpha$ -amirina y lupeol representan una alternativa importante de moléculas multi blanco, ya que además de ser agonistas duales a PPARs, ejercen efecto antiinflamatorio, lo cual representa una ventaja terapéutica para enfermedades metabólicas con carácter inflamatorio.

## 13 PERSPECTIVAS

1. Esclarecer el mecanismo de acción de estos triterpenos.
2. Establecer el efecto de los triterpenos sobre la actividad de NF-kB.
3. Analizar el efecto de los triterpenos sobre la actividad de la COX.
4. Determinar el efecto de los triterpenos en un modelo de obesidad inducida por dieta.

## 14 REFERENCIAS

- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World, 11*(5), 627-635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Agarwal, A., D'Souza, P., Johnson, T. S., Dethe, S. M., & Chandrasekaran, C. (2014). Use of in vitro bioassays for assessing botanicals. *Current Opinion in Biotechnology, 25*, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.010>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell, 124*(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Albelda, S. M., Smith, C. W., & Ward, P. A. (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 8*(8), 504-512.
- AlZaim, I., Hammoud, S. H., Al-Koussa, H., Ghazi, A., Eid, A. H., & El-Yazbi, A. F. (2020). Adipose Tissue Immunomodulation: A Novel Therapeutic Approach in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine, 7*, 602088. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.602088>
- Anand, P. K. (2020). Lipids, inflammasomes, metabolism, and disease. *Immunological Reviews, 297*(1), 108-122. <https://doi.org/10.1111/imr.12891>
- Andersen, C. J., Murphy, K. E., & Fernandez, M. L. (2016). Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Advances in Nutrition, 7*(1), 66-75. <https://doi.org/10.3945/an.115.010207>
- Aoki, T., Frøsen, J., Fukuda, M., Bando, K., Shioi, G., Tsuji, K., Ollikainen, E., Nozaki, K., Laakkonen, J., & Narumiya, S. (2017). Prostaglandin E2-EP2-NF-κB signaling in macrophages as a

potential therapeutic target for intracranial aneurysms. *Science Signaling*, 10(465), eaah6037. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah6037>

Arana-Argáez, V. E., Chan-Zapata, I., Canul-Canche, J., Fernández-Martín, K., Martín-Quintal, Z., Torres-Romero, J. C., Coral-Martínez, T. I., Lara-Riegos, J. C., & Ramírez-Camacho, M. A. (2017). IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF THE METHANOLIC EXTRACT OF CHRYSOPHYLLUM CAINITO LEAVES ON MACROPHAGE FUNCTIONS. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 14(1), 179-186. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.20>

Ashina, K., Tsubosaka, Y., Nakamura, T., Omori, K., Kobayashi, K., Hori, M., Ozaki, H., & Murata, T. (2015). Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLOS ONE*, 10(7), e0132367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132367>

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582-1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>

Ayyadevara, S., Bharill, P., Dandapat, A., Hu, C., Khaidakov, M., Mitra, S., Shmookler Reis, R. J., & Mehta, J. L. (2013). Aspirin Inhibits Oxidant Stress, Reduces Age-Associated Functional Declines, and Extends Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(5), 481-490. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4151>

Baghaki, S., Yalcin, C. E., Baghaki, H. S., Aydin, S. Y., Daghan, B., & Yavuz, E. (2020). COX2 inhibition in the treatment of COVID-19: Review of literature to propose repositioning of celecoxib

- for randomized controlled studies. *International Journal of Infectious Diseases*, *101*, 29-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1466>
- Bernareggi, D., Pouyanfard, S., & Kaufman, D. S. (2019). Development of innate immune cells from human pluripotent stem cells. *Experimental Hematology*, *71*, 13-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.12.005>
- Biswas, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1-9.  
<https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Boller, S., Soldi, C., Marques, M. C. A., Santos, E. P., Cabrini, D. A., Pizzolatti, M. G., Zampronio, A. R., & Otuki, M. F. (2010). Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*(2), 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.001>
- Bottex-Gauthier, C., Pollet, S., Favier, A., & Vidal, D. R. (2002). [The Rel/NF-kappa-B transcription factors: Complex role in cell regulation]. *Pathologie-Biologie*, *50*(3), 204-211.  
[https://doi.org/10.1016/s0369-8114\(02\)00289-4](https://doi.org/10.1016/s0369-8114(02)00289-4)
- Bulut, O., Kilic, G., & Domínguez-Andrés, J. (2021). Immune Memory in Aging: A Wide Perspective Covering Microbiota, Brain, Metabolism, and Epigenetics. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08905-x>
- Butterweck, V., & Nahrstedt, A. (2012). What Is the Best Strategy for Preclinical Testing of Botanicals? A Critical Perspective. *Planta Medica*, *78*(08), 747-754.  
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1298434>
- Chae, B. S. (2018). Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of *In Vitro* LPS-Induced Inflammatory Mediators. *Toxicological Research*, *34*(1), 65-73.  
<https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.1.065>

- Chung, H. Y., Kim, D. H., Lee, E. K., Chung, K. W., Chung, S., Lee, B., Seo, A. Y., Chung, J. H., Jung, Y. S., Im, E., Lee, J., Kim, N. D., Choi, Y. J., Im, D. S., & Yu, B. P. (2019). Redefining Chronic Inflammation in Aging and Age-Related Diseases: Proposal of the Senoinflammation Concept. *Aging and Disease*, *10*(2), 367. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0324>
- Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(4), 1233-1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
- Corlett, R. T. (2016). Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*, *38*(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, *165*, 424-443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- Davis, F. M., denDekker, A., Kimball, A., Joshi, A. D., El Azzouny, M., Wolf, S. J., Obi, A. T., Lipinski, J., Gudjonsson, J. E., Xing, X., Plazyo, O., Audu, C., Melvin, W. J., Singer, K., Henke, P. K., Moore, B. B., Burant, C., Kunkel, S. L., & Gallagher, K. A. (2020). Epigenetic Regulation of TLR4 in Diabetic Macrophages Modulates Immunometabolism and Wound Repair. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *204*(9), 2503-2513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901263>
- Delerive, P., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Fruchart, J.-C., Haegeman, G., & Staels, B. (2002). DNA Binding-Independent Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  Gene Transcription by PPAR $\alpha$ . *Molecular Endocrinology*, *16*(5), 1029-1039. <https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0826>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *29*(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

- Fernández, M. A., de las Heras, B., García, M. D., Sáenz, M. T., & Villar, A. (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(11), 1533-1539. <https://doi.org/10.1211/0022357011777909>
- Fernández, M. A., de las Heras, B., Garcia, M. D., Sáenz, M. T., & Villar, A. (2010). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(11), 1533-1539. <https://doi.org/10.1211/0022357011777909>
- Frodermann, V., & Nahrendorf, M. (2018). Macrophages and Cardiovascular Health. *Physiological Reviews*, 98(4), 2523-2569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00068.2017>
- Gebhardt, C., Hirschberger, J., Rau, S., Arndt, G., Krainer, K., Schweigert, F. J., Brunenberg, L., Kaspers, B., & Kohn, B. (2009). Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(5), 450-458. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00462.x>
- Geetha, T., & Varalakshmi, P. (1999). Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(4), 495-497. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00212-2)
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F. J., Zamilpa, A., Huang, F., Romero-Nava, R., Román-Ramos, R., & Almanza-Pérez, J. C. (2021).  $\alpha$ -Amyrin induces GLUT4 translocation mediated by AMPK and PPAR $\delta/\gamma$  in C2C12 myoblasts. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 99(9), 935-942. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2021-0027>



- Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F., Zamilpa, A., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., García-Macedo, R., Román-Ramos, R., & Almanza-Pérez, J. (2019). Triterpenoids from *Hibiscus sabdariffa* L. with PPAR $\delta$ / $\gamma$  Dual Agonist Action: In Vivo, In Vitro and In Silico Studies. *Planta Medica*, *85*(05), 412-423. <https://doi.org/10.1055/a-0824-1316>
- Golden, J. M., Escobar, O. H., Nguyen, M. V. L., Mallicote, M. U., Kavarian, P., Frey, M. R., & Gayer, C. P. (2018). Ursodeoxycholic acid protects against intestinal barrier breakdown by promoting enterocyte migration via EGFR- and COX-2-dependent mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *315*(2), G259-G271. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00354.2017>
- Griffin, C., Eter, L., Lanzetta, N., Abrishami, S., Varghese, M., McKernan, K., Muir, L., Lane, J., Lumeng, C. N., & Singer, K. (2018). TLR4, TRIF, and MyD88 are essential for myelopoiesis and CD11c+ adipose tissue macrophage production in obese mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(23), 8775-8786. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001526>
- Gutierrez-Lugo, M.-T., Deschamps, J. D., Holman, T. R., Suarez, E., & Timmermann, B. N. (2004). Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Medica*, *70*(3), 263-265. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818920>
- Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017). PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- $\beta$ / $\delta$  and PPAR- $\gamma$ . *Future Cardiology*, *13*(3), 279-296. <https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
- Harrold, A. P., Cleary, M. M., Bharathy, N., Lathara, M., Berlow, N. E., Foreman, N. K., Donson, A. M., Amani, V., Zuercher, W. J., & Keller, C. (2020). In vitro benchmarking of NF- $\kappa$ B inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, *873*, 172981. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172981>

- Hayashi, S., Sumi, Y., Ueno, N., Murase, A., & Takada, J. (2011). Discovery of a novel COX-2 inhibitor as an orally potent anti-pyretic and anti-inflammatory drug: Design, synthesis, and structure–activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, *82*(7), 755-768.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.036>
- Hsueh, W. A., & Law, R. (2003). The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, *92*(4A), 3J-9J. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(03\)00610-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00610-6)
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, *2*(5-6), 231-237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Huang, W., & Glass, C. K. (2010). Nuclear receptors and inflammation control: Molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(8), 1542-1549. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191189>
- Inoue, H., Mori, T., Shibata, S., & Koshihara, Y. (1989). Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *British Journal of Pharmacology*, *96*(1), 204-210. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb11801.x>
- Izaola, O., de Luis, D., Sajoux, I., Domingo, J. C., & Vidal, M. (2015). [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(6), 2352-2358.  
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829>
- Jaczewska, J., Abdulreda, M. H., Yau, C. Y., Schmitt, M. M., Schubert, I., Berggren, P.-O., Weber, C., Koenen, R. R., Moy, V. T., & Wojcikiewicz, E. P. (2014). TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration. *Journal of Leukocyte Biology*, *95*(2), 265-274.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0412205>

- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., ... Kadowaki, T. (2006). Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26602-26614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601284200>
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1172/JCI26498>
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., & Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1851*(4), 414-421. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.07.008>
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *320*(3), C375-C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>
- Kawamoto, H., & Minato, N. (2004). Myeloid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(8), 1374-1379. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.020>
- Köckerling, F., Köckerling, D., & Lomas, C. (2013). Cornelius Celsus—Ancient encyclopedist, surgeon—scientist, or master of surgery? *Langenbeck's Archives of Surgery*, *398*(4), 609-616. <https://doi.org/10.1007/s00423-013-1050-0>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

- L., S., R., C., F., F., & G.P., Z. (2013). Innovative Formulations for the Controlled and Site-specific Delivery of Antiinflammatory Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 19(41), 7219-7236. <https://doi.org/10.2174/138161281941131219124517>
- Lacy, P. (2015). Editorial: Secretion of Cytokines and Chemokines by Innate Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00190>
- Larsen, G. L., & Henson, P. M. (1983). Mediators of Inflammation. *Annual Review of Immunology*, 1(1), 335-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.01.040183.002003>
- Lee, A. J., & Zietsch, B. P. (2011). Experimental evidence that women's mate preferences are directly influenced by cues of pathogen prevalence and resource scarcity. *Biology Letters*, 7(6), 892-895. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0454>
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)*, 8(15), e2004433. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>
- Liu, K., Zhang, X., Xie, L., Deng, M., Chen, H., Song, J., Long, J., Li, X., & Luo, J. (2021). Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, 164, 105373. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105373>
- Liu, L., Li, R., Pan, Y., Chen, J., Li, Y., Wu, J., & Zhu, Y. (2011). High-throughput screen of protein expression levels induced by cyclooxygenase-2 during influenza a virus infection. *Clinica Chimica Acta*, 412(11-12), 1081-1085. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.02.028>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

- Liu, Y., Fang, S., Li, X., Feng, J., Du, J., Guo, L., Su, Y., Zhou, J., Ding, G., Bai, Y., Wang, S., Wang, H., & Liu, Y. (2017). Aspirin inhibits LPS-induced macrophage activation via the NF- $\kappa$ B pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 11549. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10720-4>
- Louwe, P. A., Badiola Gomez, L., Webster, H., Perona-Wright, G., Bain, C. C., Forbes, S. J., & Jenkins, S. J. (2021). Recruited macrophages that colonize the post-inflammatory peritoneal niche convert into functionally divergent resident cells. *Nature Communications*, 12(1), 1770. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21778-0>
- Mackman, N., Tilley, R. E., & Key, N. S. (2007). Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), 1687-1693. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141911>
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7303-7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- Medeiros, R., Otuki, M. F., Avellar, M. C. W., & Calixto, J. B. (2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene  $\alpha$ -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, 559(2-3), 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.12.005>
- Michalik, L., & Wahli, W. (2008). PPARs Mediate Lipid Signaling in Inflammation and Cancer. *PPAR Research*, 2008, 134059. <https://doi.org/10.1155/2008/134059>
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamsad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 502-513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>

- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 8(3), 227-241.  
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126-1167.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Moon, H.-G., Kim, Y.-S., Choi, J.-P., Choi, D.-S., Yoon, C. M., Jeon, S. G., Gho, Y. S., & Kim, Y.-K. (2010). Aspirin attenuates the anti-inflammatory effects of theophylline via inhibition of cAMP production in mice with non-eosinophilic asthma. *Experimental and Molecular Medicine*, 42(1), 47. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.1.005>
- Müller, L., Di Benedetto, S., & Pawelec, G. (2019). The Immune System and Its Dysregulation with Aging. En J. R. Harris & V. I. Korolchuk (Eds.), *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science* (Vol. 91, pp. 21-43). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_2)
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275-301.  
<https://doi.org/10.1042/EBC20160017>
- Novotný, J., & Penka, M. (2012). [Disturbances of hemostasis in sepsis]. *Vnitřní Lekarství*, 58(6), 439-447.
- Nunes, C. D. R., Barreto Arantes, M., Menezes de Faria Pereira, S., Leandro da Cruz, L., de Souza Passos, M., Pereira de Moraes, L., Vieira, I. J. C., & Barros de Oliveira, D. (2020). Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(16), E3726.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25163726>

- Ojulari, O. V., Lee, S. G., & Nam, J.-O. (2019). Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on Obesity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(1), E210. <https://doi.org/10.3390/molecules24010210>
- Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*, *72*, 219-246. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>
- Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, Â., Yunes, R. A., & Calixto, J. B. (2005). Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyirin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, *507*(1-3), 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.11.012>
- Owona, B. A., Abia, W. A., & Moundipa, P. F. (2020). Natural compounds flavonoids as modulators of inflammasomes in chronic diseases. *International Immunopharmacology*, *84*, 106498. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106498>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Peleli, M., Ferreira, D. M. S., Tarnawski, L., McCann Haworth, S., Xuechen, L., Zhuge, Z., Newton, P. T., Massart, J., Chagin, A. S., Olofsson, P. S., Ruas, J. L., Weitzberg, E., Lundberg, J. O., & Carlström, M. (2020). Dietary nitrate attenuates high-fat diet-induced obesity via mechanisms involving higher adipocyte respiration and alterations in inflammatory status. *Redox Biology*, *28*, 101387. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101387>
- Pelka, K., & De Nardo, D. (2018). Emerging Concepts in Innate Immunity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1714*, 1-18. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8_1)
- Pendyala, S., & Natarajan, V. (2010). Redox regulation of Nox proteins. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *174*(3), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.09.016>

- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1154-1162. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004>
- Philip, M., Rowley, D. A., & Schreiber, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.006>
- Praveena, P. E., Periasamy, S., Kumar, A. A., & Singh, N. (2010). Cytokine profiles, apoptosis and pathology of experimental *Pasteurella multocida* serotype A1 infection in mice. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.012>
- Preetha, S. P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., & Varalakshmi, P. (2006). Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.03.008>
- Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
- Roe, K. (2021). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(2). <https://doi.org/10.1111/sji.12970>
- Rojas-Dotor, S., Pérez-Ramos, J., & Rico-Rosillo, M. G. (2009). [Chemotaxis and disease]. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 47(1), 51-56.
- Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, 285(2), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.033>
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology*, 3(2), 143-150. <https://doi.org/10.1038/ni749>



- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, *26*(1), 421-452.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>
- Shao, X., Wang, M., Wei, X., Deng, S., Fu, N., Peng, Q., Jiang, Y., Ye, L., Xie, J., & Lin, Y. (2016). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ : Master Regulator of Adipogenesis and Obesity. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *11*(3), 282-289.  
<https://doi.org/10.2174/1574888x10666150528144905>
- Singh, D., Arya, P. V., Sharma, A., Dobhal, M. P., & Gupta, R. S. (2015). Modulatory potential of  $\alpha$ -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in Wistar albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *161*, 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.025>
- Sprague, A. H., & Khalil, R. A. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, *78*(6), 539-552.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.029>
- Sudhahar, V., Kumar, S. A., & Varalakshmi, P. (2006). Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences*, *78*(12), 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.011>
- Suzuki, K., Tominaga, T., Ruhee, R. T., & Ma, S. (2020). Characterization and Modulation of Systemic Inflammatory Response to Exhaustive Exercise in Relation to Oxidative Stress. *Antioxidants*, *9*(5), 401. <https://doi.org/10.3390/antiox9050401>
- Takeda, K. (2004). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, *17*(1), 1-14.  
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *279*(6), L1005-1028.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>

- Thumann, T. A., Pferschy-Wenzig, E.-M., Moissl-Eichinger, C., & Bauer, R. (2019). The role of gut microbiota for the activity of medicinal plants traditionally used in the European Union for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, *245*, 112153.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112153>
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, *27*, 693-733.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641>
- van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, *8*, 47.  
<https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
- Vasconcelos, J. F., Teixeira, M. M., Barbosa-Filho, J. M., Lúcio, A. S. S. C., Almeida, J. R. G. S., de Queiroz, L. P., Ribeiro-dos-Santos, R., & Soares, M. B. P. (2008). The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology*, *8*(9), 1216-1221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.04.011>
- Wahli, W., & Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *23*(7), 351-363.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>
- Wang, D., & DuBois, R. N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*, *29*(6), 781-788. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.421>
- Wang, S., Dougherty, E. J., & Danner, R. L. (2016). PPAR $\gamma$  signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. *Pharmacological Research*, *111*, 76-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.028>

- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Yaghoobi, R., Kazerouni, A., & kazerouni, O. (2013). Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, *8*(3), 100-104. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-9487>
- Zhang, T., Ma, C., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2021). NF-κB signaling in inflammation and cancer. *MedComm*, *2*(4), 618-653. <https://doi.org/10.1002/mco2.104>
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., & Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>
- Zhong, J., & Shi, G. (2019). Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*, 737. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00737>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00250

Matrícula: 2202800568

Evaluación del potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -amirina y lupeol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y en el modelo murino de edema por TPA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 17 del mes de noviembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ  
DRA. FENGYANG HUANG  
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ  
DR. RODRIGO ROMERO NAVA



SFRGIO DAVID GARCIA GARCIA  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: SERGIO DAVID GARCIA GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ

VOCAL

DRA. FENGYANG HUANG

VOCAL

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

SECRETARIO

DR. RODRIGO ROMERO NAVA