



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**“ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL ACETATO DE  
CACALOL SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NF-KB  
ACTIVADA POR LPS”**

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

**PRESENTA:**

**Mtra. En Biol. Exp. Beatriz Mora Ramiro**

**Matricula: 2143800955**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Director.**

**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.**

**Asesor interno.**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.**

**Asesor externo.**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

**Iztapalapa, Ciudad de México, 8 de septiembre de 2021**

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 25 de agosto de 2021

Comisión Académica del Posgrado

### **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presente

La que suscribe **MORA RAMIRO BEATRIZ** alumna con número de matrícula **2143800955**, 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 “**ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL ACETATO DE CACALOL SOBRE LA VÍA DE NF-KB**” a desarrollar en **LA UAM-I Y EL INCMNSZ** 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.



---

**Mora Ramiro Beatriz**

## Declaración de originalidad

La que suscribe **MORA RAMIRO BEATRIZ**, alumna del posgrado en **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “**ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL ACETATO DE CACALOL SOBRE LA VÍA DE NF-KB**”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **DOCTORA 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 **25 de AGOSTO** del **2021**.

Atentamente



**Mora Ramiro Beatriz**

## COMITÉ TUTORAL

### **Director.**

**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.**

Profesor titular C.

Depto. Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

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

### **Asesor interno**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.**

Profesor titular C.

Depto. Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

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

### **Asesor externo.**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa.**

Profesor titular C.

Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de  
Investigaciones Biomédicas.

Universidad Nacional Autónoma de México.

[azentell@iibiomedicas.unam.mx](mailto:azentell@iibiomedicas.unam.mx)

“El Programa de Doctorado 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 a la alumna Beatriz Mora Ramiro con el Número de Becario 570655

Para la realización del proyecto se contó con el apoyo de CONACyT; FORDECYT-PRONACES (Ciencia de Frontera 377882/2020).

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada “**Acción antiinflamatoria del acetato de cacalol sobre la vía de señalización de NF-kB activada por LPS**” que presentó la Maestra en Biología Experimental Beatriz Mora Ramiro el día 8 de septiembre del 2021.

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.  
Profesor titular C.  
Depto. Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
[aaaf@xanum.uam.mx](mailto:aaaf@xanum.uam.mx)



Dr. Alejandro Zentella Dehesa.  
Profesor titular C.  
Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas.  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
[azentell@iibiomedicas.unam.mx](mailto:azentell@iibiomedicas.unam.mx)



Dr. Samuel Enoch Estrada Soto.  
Profesor titular C.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
[enoch@uaem.mx](mailto:enoch@uaem.mx)



Dr. Elí Terán Cabanillas.  
Universidad Autónoma de Sinaloa.  
[eteranc@uas.edu.mx](mailto:eteranc@uas.edu.mx)



## **DEDICATORIA**

### ***A mis padres: Valentina y Dario***

*Por ser el pilar fundamental de todo lo que soy como persona, por su apoyo incondicional en mí desarrollo académica, pero sobre todo, por enseñarme a amar y valorar todo lo que tengo en mi vida.*

*Por siempre apoyarme, por infundirme siempre el valor para superarme, por su constante motivación para ser una persona de bien, pero principalmente por su darme siempre su amor incondicional.*

*Este trabajo y mis logros han sido posibles solo gracias a ustedes.*

### ***A mis hermanos: Guillermo y Carlos***

*Por estar siempre conmigo y participar de forma directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis, pero, sobre todo porque siempre han aportado cosas buenas en mi vida, por los grandes momentos de felicidad y por todos los momentos que hemos compartido juntos.*

***...GRACIAS LOS QUIERO MUCHO***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Julio Cesar Almanza**, por su paciencia, sus consejos, por dirigirme por el camino de la investigación, por la confianza que me ha dado desde hace varios años y sobre todo por apoyarme y ayudarme en mi formación académica durante todo este tiempo ¡Gracias!

Al **Dr. Alejandro Zendella Dehesa** por todas las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio, ya que ese fue un punto clave para la realización de este trabajo, por su orientación, sus consejos, sugerencias y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz** por siempre estar disponible cuando necesitaba su asesoría, por sus comentarios y consejos que permitieron enriquecer mi trabajo y por siempre motivarme para realizar un buen trabajo.

A los **Doctores Samuel Enoch Estrada Soto y Eli Terán Cabanillas** por sus comentarios del proyecto, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y por sus valiosas observaciones a esta.



Agradezco al **M. C. José Luis Ventura Gallegos**, técnico académico del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo técnico, por su orientación académica, por toda el tiempo y paciencia que me brindo durante la realización de los experimentos.

A todos los que conforman **Laboratorio de Farmacología** por su ayuda, sus ocurrencias y sobre todo por hacer que cada día el trabajo en el laboratorio sea agradable y divertido.

A todos los que conforman **Laboratorio de la Unidad de Bioquímica**, por su ayuda en cada momento, por todo lo que me enseñaron, por su paciencia, por hacer divertida siempre la estancia en el laboratorio y por todos los momentos divertidos que pasamos juntos.

También quiero agradecer a Víctor, Wendy, Memo, Bea, Joel por siempre estar apoyándome en todo sentido, por sus consejos, risas, afecto y sobre todo por estos años de momentos divertidos y felices que hemos pasado juntos

## ABREVIATURAS

<b>5-LO</b>	Lipoxigenasa
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AINEs</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>APP</b>	Proteínas de Fase Aguda
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CA</b>	Acetato de cacalol
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CCA</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa2
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>EMSA</b>	Ensayo de Movilidad Electroforetica
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>ICAM</b>	Moléculas de Adhesión Intercelular
<b>IFN-γ</b>	Interferón Gamma
<b>IL-1</b>	Interleucina1
<b>IL-12</b>	Interleucina 12

<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico inducible
<b>IκB</b>	Inhibidor de κB
<b>LBP</b>	Proteína de unión al LPS
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Leucotrienos
<b>LX</b>	Lipoxinas
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasa de la matriz
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>MTT</b>	Metiltiazoltetrazolio
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Especie Reactivas de Nitrógeno
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OONO<sup>-</sup></b>	Peroxi nitríto
<b>PAF</b>	Factor Agregador de Plaquetas
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de Fosfatos
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C

<b>PLA2</b>	Fosfolipasa citosólica A2
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PRR</b>	Receptores de Reconocimiento de Patrones
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Transcripción en Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>TX</b>	Tromboxanos
<b>VCAM</b>	Moléculas de Adhesión Intercelular Vasculares

## **RESUMEN**

### **Introducción**

La inflamación es una respuesta biológica natural en donde interaccionan factores solubles celulares, diferentes poblaciones celulares del sistema inmune innato y adaptativo y otras poblaciones celulares como las células endoteliales. Este proceso puede surgir en cualquier tejido vascularizado en respuesta a estímulos externos (lesión traumática o infecciones) o internos (reacciones autoinmunes) que han lesionado su integridad. El proceso normalmente al control y resolución de la infección, a la recuperación tisular y la curación. La inflamación parece estar diseñada para funcionar en microambientes tisulares de forma rápida y aislada. Las vías de señalización intracelular que activan a las células que participan en la reacción inflamatoria requieren de la activación del sistema del control transcripcional NF- $\kappa$ B. En ocasiones esta respuesta puede alterarse produciendo daño permanente y consecuencias patológicas asociadas con enfermedades cardiovasculares, respiratorias, digestivas o autoinmunes. Un caso extremo se presenta durante el choque séptico en donde deja de haber procesos locales y la inflamación se convierte en un proceso sistémico. La presentación de formas descontroladas de la inflamación han llevado a la búsqueda y desarrollo de compuestos capaces de interferir con el proceso inflamatorio diferentes niveles.

Existe un gran número de fármacos antiinflamatorios, esteroideos y no esteroideos, los cuales ejercen su acción farmacológica mediante el bloqueo de moléculas mediadoras de la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se ha reportado que, independientemente de la naturaleza esteroidea o

no esteroidea de los fármacos antiinflamatorios, cuando se consumen por periodos largos pueden generar efectos adversos, lo cual justifica la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios. México cuenta con gran variedad de especies vegetales con diferentes usos medicinales. *Psacalium decompositum* se usa en la medicina tradicional como antidiabética y antiinflamatoria. Entre los principales compuestos identificados en *P. decompositum* se encuentra el cacalol el cual se ha reportado que presenta actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda. Así mismo se ha reportado que el compuesto es muy fácil de oxidar, pero, al acetilarlo en su grupo OH su estructura se vuelve es más estable, produciendo acetato de cacalol (CA). Sin embargo, poco se ha avanzado en el conocimiento de las actividades de este compuesto y del mecanismo de acción antiinflamatoria que podría presentar.

### **Objetivo**

Determinar la acción del acetato de cacalol sobre la vía de señalización de NF- $\kappa$ B así como en la producción de mediadores inflamatorios.

### **Materiales y métodos**

Se cultivaron macrófagos de la línea RAW 264.7 y células endoteliales HUVEC provenientes de cultivo primario. Los macrófagos de la línea RAW 264.7 y células endoteliales HUVEC fueron tratadas con concentraciones diferentes de CA (35, 50, 70 y 100  $\mu$ M) y posteriormente estimulados con LPS (5  $\mu$ g/mL) para inducir una respuesta inflamatoria. En los macrófagos RAW 264.7 se evaluaron las citocinas

TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  midiendo su expresión relativa por medio de qPCR y la concentración por medio del método de ELISA. Posteriormente se midió la expresión por medio de qPCR, la abundancia proteica por inmunoensayos tipo Western Blot y la de actividad de COX-2. También se realizó un EMSA en cual se evaluaron las interacciones del factor de transcripción NF- $\kappa$ B con su secuencia consenso y por medio inmunoensayos tipo Western Blot se evaluó p65, IKB- $\alpha$  y el complejo IKK proteínas importantes rio arriba de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. En las células HUVEC se evaluó la expresión de ARNm por medio de qPCR y la producción de proteínas de ICAM y VCAM por inmunoensayos tipo Western Blot. En el medio de cultivo se cuantifico la concentración de NO por la técnica de Griess y se midió a una absorbancia a 540 nm. En las células HUVEC al igual que en los macrófagos RAW 264.7 también se evaluó por medio de inmunoensayos tipo Western Blot a p65, IKB- $\alpha$  y el complejo IKK, proteínas importantes rio arriba de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Por último se realizó un ensayo de adhesión entre las células HUVEC y las células U-937 marcadas con timidina tritiada y posteriormente se cuantifico la cantidad de radioactividad en un contador de centelleo en donde se cuantifico las células U-937 marcadas adheridas a las células HUVEC.

## **Resultados**

Los resultados mostraron que en macrófagos RAW 264.7 el CA inhibió la expresión y la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . También disminuyó la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y con esto inhibió la señalización aguas arriba, disminuyendo los niveles de fosforilación de IKB- $\alpha$  y p65. CA. Además, disminuyó la actividad y la expresión del ARNm de COX-2.

En el caso de las células HUVEC CA inhibió la expresión y la producción de ICAM y VCAM. Al igual que en los macrófagos en HUVEC CA también inhibió la señalización aguas arriba, disminuyendo los niveles de fosforilación de IKB- $\alpha$  y p65; así como una disminución en la producción de NO. En el caso del ensayo de adhesión también se observó una disminución en la adhesión de las células U-937 a las células HUVEC.

### **Conclusión**

El posible mecanismo del CA es afectar la fosforilación de IKB- $\alpha$  y con esto disminuir la fosforilación de IKB- $\alpha$ , lo que generó una disminución de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo induciendo una disminución en citocinas, moléculas de adhesión, NO, COX-2, entre otras moléculas, generando con esto su efecto antiinflamatorio.

Estos resultados apoyan la idea de que este compuesto podría ser la base para la síntesis de la próxima generación de fármacos antiinflamatorios.



## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Inflammation is a natural biological response in which soluble cellular factors, different populations of the innate and adaptive immune response in others cells type, such the endothelial cells interact. This process can arise in any vascularized tissue in response to external stimuli (traumatic injury or infections) or internal stimuli (autoimmune reactions) that have damaged its integrity. Inflammation is designed to function within the tissue-microenvironment to provide a local and insolated response. The signaling pathway activated in this cells populations is NF- $\kappa$ B system. The process normally leads to recovery from infection and healing. Sometimes this response can be altered, producing permanent damage and pathological consequences associated with cardiovascular, respiratory, digestive or autoimmune diseases. A extreme case occurs during septic shock were the local effect becomes systemic.

There is a large number of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs, which exert their pharmacological action by blocking molecules that mediate the initiation and amplification of the inflammatory response. However, it has been reported that, regardless of the steroidal or non-steroidal nature of anti-inflammatory drugs, when consumed for long periods of time they can generate adverse effects, which justifies the search for new anti-inflammatory compounds. Mexico has a great variety of plant species with different medicinal uses. *Psacalium decompositum* is used in traditional medicine as both an antidiabetic and anti-inflammatory. Among the identified compounds in *P. decompositum* the main is cacalol, which has been

reported to have anti-inflammatory activity in acute inflammation models. Likewise, it has been reported that the compound is very easy to oxidize, but, when acetylated in its OH group, its structure becomes more stable, producing cacalol acetate (CA). However, little progress has been made in understanding the activities of this compound and the mechanism of anti-inflammatory action that it could present.

### **Objective**

To determine the action of cacalol acetate on the NF- $\kappa$ B signaling pathway as well as on the production of inflammatory mediators.

### **Materials and methods**

Macrophages of the RAW 264.7 line and HUVEC endothelial cells from primary culture were cultured. Macrophages of the RAW 264.7 line and HUVEC endothelial cells were treated with different concentrations of CA (35, 50, 70 and 100  $\mu$ M) and subsequently stimulated with LPS (5  $\mu$ g / mL) to induce an inflammatory response. RAW 264.7 macrophages were evaluated for the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  measuring its relative expression using qPCR and protein concentration using the ELISA method. Subsequently, the expression was measured by qPCR, the protein concentration by Western Blot and the activity of COX-2.

An EMSA was also performed in which the interactions of the transcription factor NF- $\kappa$ B with its consensus sequence were evaluated, and by means of Western Blot p65, I $\kappa$ B- $\alpha$  and the IKK complex were evaluated, all important upstream proteins of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

In HUVEC cells, mRNA expression was evaluated by means of qPCR and the production of ICAM and VCAM proteins by Western Blot. In the culture medium, the NO concentration was quantified by the Griess technique and absorbance was measured at 540 nm. In HUVEC cells, as in RAW 264.7 macrophages, p65, IKB- $\alpha$  and the IKK complex were also evaluated by Western Blot, all important upstream proteins of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Finally, an adhesion assay was performed between HUVEC cells and U-937 cells labeled with tritiated-thymidine. Subsequently the amount of radioactivity was quantified in a scintillation counter where the labeled U-937 cells adhered to the HUVEC cells were quantified.

## **Results**

The results showed that in RAW 264.7 macrophages, CA inhibited the expression and production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ . It also inhibited the activation of NF- $\kappa$ B and its upstream signaling, decreasing the levels of phosphorylation in IKB- $\alpha$  and p65. AC. In addition, the activity and expression of COX-2 mRNA decreased.

In the case of HUVEC cells, CA inhibited the expression and production of ICAM and VCAM. In macrophages as well as HUVEC cells, CA also inhibited upstream signaling, decreasing the levels of phosphorylation in IKB- $\alpha$  and p65; as well as a decrease in NO production. In the case of the adhesion test, a decrease in the adhesion of U-937 cells to HUVEC cells was also observed.

## **Conclusion**

A possible mechanism of CA is to affect the phosphorylation of IKB- $\alpha$ . The decrease of the phosphorylation of IKB- $\alpha$  generated a decrease in the translocation of NF- $\kappa$ B

to the nucleus, inducing a decrease in cytokines, adhesion molecules, NO, COX-2, among other molecules, thereby generating its inflammatory effect. This compound could be the basis for the synthesis of next generation anti-inflammatory drugs.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Inflamación.....	1
1.1.1 Mediadores inflamatorios.....	5
1.2 Respuesta inflamatoria .....	8
1.2.1 Macrófagos y su activación.....	9
1.2.2 Endotelio y su activación .....	10
1.3 El LPS .....	13
1.3.1 El LPS como inductor de la vía de NF- $\kappa$ B.....	15
1.3.2 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B).....	16
1.4 Enfermedades crónicas caracterizadas por presentar procesos inflamatorios.....	20
1.5 Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria .....	23
1.5.1 Modelo de edema en oreja inducido por TPA.....	24
1.5.2 Modelo de estimulación de macrófagos con LPS.....	25
1.5 Tratamientos farmacológicos para la inflamación. ....	26
1.5.1 Medicina tradicional utilizada en la inflamación. ....	29
2. ANTECEDENTES .....	31
2.1 Complejo matarique .....	31
2.1.1 <i>Psacalium decompositum</i> (A. Gray) H. Rob. & Brettell.....	31
2.1.2 Pruebas biológicas y compuestos de <i>Psacalium decompositum</i> . ....	34
3. JUSTIFICACIÓN .....	38
4. HIPÓTESIS .....	40
5. OBJETIVO GENERAL.....	40
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	40

7. MATERIAL Y MÉTODO .....	41
7.1 Material vegetal.....	41
7.2 Obtención de los extractos de la raíz de <i>Psacalium decompositum</i> . .....	41
7.2.1 Obtención de cacalol .....	41
7.2.2 Obtención del acetato de cacalol.....	42
7.3 Modelo de evaluación anti-inflamatoria in vitro. ....	43
7.3.1 Cultivos celulares.....	43
7.3.2 Prueba de Cristal violeta.....	45
7.3.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6) ..	46
7.3.4 Análisis de la transcripción génica en células RAW 264.7 y HUVEC ....	47
7.3.5 Extracción de proteína.....	49
7.3.6 Ensayo de cambio de movilidad electroforético (EMSA) .....	50
7.3.7 Inmunoensayos tipo Western Blot .....	51
7.3.8 Actividad de COX-2 .....	52
7.3.9 Ensayo de Adhesión de células U-937 sobre HUVEC.....	52
7.3.10 Ensayo de Griess para cuantificación de NO en HUVEC .....	53
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	54
9. RESULTADOS .....	55
9.1 Análisis fitoquímico .....	55
9.1.1 Obtención del cacalol.....	55
9.1.2 Obtención del acetato de cacalol.....	56
9.2 Evaluación in vitro .....	56
9.2.1 Prueba de Cristal Violeta .....	56
9.2.2 Secreción de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ e IL-6 .....	58
9.2.3 Expresión relativa de TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ e IL-6 .....	60
9.2.4 Actividad, expresión y producción de COX-2.....	61

9.2.5 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	63
9.2.6 Efecto del CA en la vía de activación de NF- $\kappa$ B estimulada por LPS. ...	64
9.2.7 Respuestas funcionales en células HUVEC tratadas con CA / LPS.....	72
10. DISCUSIÓN .....	77
11. CONCLUSIONES.....	88
12. PERSPECTIVAS.....	89
13. REFERENCIAS.....	90
14. ANEXOS .....	101

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Inflamación

El sistema inmune es esencial para combatir las infecciones, que inicia con el desarrollo de fenómenos inflamatorios. Sin embargo, a pesar de que el objetivo sea frenar el crecimiento de microorganismos este proceso causa lesiones locales y/o sistémicas, siendo a veces difícil discernir entre los aspectos beneficiosos y perjudiciales (Kishore, Kumar, Shanker, & Verma, 2019; Kong & Xu, 2018).

En términos generales la inflamación es una respuesta biológica natural en donde interaccionan factores solubles celulares, diferentes poblaciones del sistema inmune e incluso otros tipos celulares como las células del endotelio vascular. Este proceso puede surgir en cualquier tejido vascularizado en respuesta a estímulos externos (lesión traumática o infecciones) o internos (reacciones autoinmunes) que han lesionado su integridad. El proceso normalmente conduce al control y eliminación de la infección. Sin embargo, si la destrucción dirigida y la reparación asistida no se escalonan adecuadamente, la inflamación puede conducir a un daño tisular persistente ocasionado por la acción de leucocitos, linfocitos o colágeno. Los cinco signos clásicos de la inflamación son: enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y la consiguiente pérdida de la función de los órganos. Estos signos son consecuencia de efectos inducidos por los mediadores proinflamatorios (prostaglandinas y citocinas) en el flujo sanguíneo local, la permeabilidad vascular, la infiltración de leucocitos y la liberación de agentes inductores de dolor (Berk et al., 2019; Cheng et al., 2017; Feehan & Gilroy, 2019). Su objetivo es promover la eliminación del agente



dañino y restaurar el funcionamiento normal del tejido u órgano afectado. Dependiendo de la naturaleza del agente infeccioso o de la "causa irritante", distinguimos los siguientes tipos de inflamación: inflamación microbiana, autoinmune, alérgica, metabólica, asociada a procesos de cáncer y física. La inflamación microbiana, causada por bacterias, virus, hongos y protozoos, genera abscesos y granulomas, neumonía, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y otras enfermedades infecciosas. La inflamación autoinmune, causada por un ataque autoinmune aberrante por autoanticuerpos o células B y T autorreactivas, media la artritis reumatoide, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes. La inflamación alérgica, causada por alérgenos, media en dermatitis atópica, rinitis alérgica, asma y otras enfermedades alérgicas. La inflamación metabólica, causada por la sobrealimentación y la acumulación excesiva de metabolitos (por ejemplo, ácido úrico o ésteres de colesterol) como resultado de una disfunción metabólica congénita o adquirida, media a la gota o la aterosclerosis, entre otras enfermedades metabólicas. En el caso de la inflamación física, esta es causada por traumatismos, quemaduras y radiación (Kotas & Medzhitov, 2015; Matsuzawa-Ishimoto, Hwang, & Cadwell, 2018; Sato & Yanagita, 2018).

La inflamación localizada genera una respuesta de protección estrechamente controlada por el organismo en el lugar de la lesión. La pérdida de este control local o la aparición de una respuesta de hiperactivada condicionan una repuesta sistémica que se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS. Una vez iniciada la respuesta inflamatoria se ponen en marcha mecanismos compensadores

destinados a generar un balance entre el SIRS y mecanismos antiinflamatorios .Sin embargo, el balance puede perderse produciendo un fallo de forma permanente, que puede tener consecuencias patológicas (Cho et al., 2013; Cho et al., 2014; Medzhitov, 2010)

En términos generales los signos macroscópicos que suelen acompañar la inflamación son: incremento de la temperatura (calor), eritema (rubor), edema (hinchazón o reacción inmediata o transitoria) y algesia (dolor), así como la pérdida de la función tisular en casos de inflamación crónica y se puede clasificar en dos grandes grupos dependiendo de su duración:

- **Inflamación aguda.** Es aquella que se presenta en un lapso relativamente corto con una duración de minutos, horas o de pocos días. Su principal característica es el aumento del diámetro de los vasos sanguíneos mediada por la liberación de óxido nítrico (NO) (vasodilatación), una disminución en las adhesiones ocluyentes del endotelio vascular local, lo cual lleva a la exudación de fluidos (edema). Ésta es la razón del enrojecimiento y del aumento de temperatura en la zona lesionada. El aumento en la permeabilidad vascular aumenta dando como resultado de una disminución de las uniones intercelulares, lo que se traduce en mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos cercanos, permitiendo incluso el paso de proteínas plasmáticas. El edema resultante es responsable de la acumulación de líquido en el tejido. Le sigue la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia el sitio de la lesión (extravasación). Esta quimiotaxis está guiada por quimiocinas y citocinas liberadas por células residentes y es amplificada por las células endoteliales y los neutrófilos reclutados. La migración se inicia con

una serie de eventos como la producción de mediadores inflamatorios: citocinas proinflamatorias (interleucinas: IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12; factor de necrosis tumoral: TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ), mediadores lipídicos (prostaglandinas: PG, leucotrienos: LT, tromboxanos: TX y factor activador de plaquetas: PAF), aminas (histamina y serotonina), Óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno y proteasas plasmáticas (factor de complemento (C3) y cinasas, entre otros (Egbewande, Nilsson, White, Coster, & Davis, 2017; Jones, Robb, Perretti, & Rossi, 2016; Kotas & Medzhitov, 2015).

- **Inflamación crónica.** Es una respuesta prolongada de la inflamación que resulta de un daño que no pudo ser reparado o la persistencia de un agente irritante. La inflamación también puede perpetuarse por la sobreproducción de mediadores inflamatorios (prostaglandinas, TNF- $\alpha$ , IL-6, NO). Se distingue de la inflamación aguda por la presencia de diferentes poblaciones celulares como los macrófagos con fenotipo TH1 o Th2. Tiene una duración de semanas o meses y presenta un flujo de linfocitos, macrófagos y crecimiento de fibroblastos. Se caracteriza por la destrucción de tejido y en algunos casos se produce lesión tisular por las altas concentraciones de enzimas hidrolíticas y especie reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, NOS), que puede concluir en la pérdida de la función de la parte afectada. Un ejemplo de enfermedad que involucra inflamación crónica es la artritis reumatoide (Singh et al., 2019; Tursi & Elisei, 2019)

### 1.1.1 Mediadores inflamatorios

Las células inmunitarias características de la respuesta innata y adaptativa responden a las agresiones proinflamatorias produciendo mediadores inflamatorios intracelulares y extracelulares al tiempo que exhiben sus receptores afines. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria se perpetúa mediante ciclos de retroalimentación y amplificación.

Los mediadores inflamatorios pueden agruparse de diferentes formas, por ejemplo dependiendo de la función que desempeñan:

- Aminas vasoactivas (histamina y serotonina). Se producen cuando hay desgranulación de plaquetas y mastocitos. Éstas tienen efectos complejos sobre la vasculatura, causando un aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación o vasoconstricción, dependiendo del estímulo (Medzhitov, 2008, 2010)
- Quimiocinas. Se producen por muchos tipos de células en respuesta a inductores de la inflamación. Controlan la extravasación de leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados (Kotas & Medzhitov, 2015).
- Fragmentos del sistema de complemento (C3a, C4a y C5a) también conocidos como anafilotoxinas. Se producen por varias vías de activación del complemento. C5a (y en menor medida C3a y C4a) promueven el reclutamiento de granulocitos y monocitos e inducen la desgranulación de los mastocitos, lo que afecta el sistema vascular (Medzhitov, 2008; Medzhitov & Horng, 2009).

- Enzimas proteolíticas (elastina, catepsinas y metaloproteinasas de la matriz). Estas moléculas tienen diversas funciones en la inflamación, incluyendo la defensa del huésped, la remodelación tisular y la migración de leucocitos (Medzhitov, 2008).
- Mediadores lipídicos (eicosanoides y factores activadores de plaquetas). Se derivan de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, que están presentes en la cara interna de las membranas celulares. Después de la activación por iones de Calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular, la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2) genera ácido araquidónico (AA) y ácido lisofosfatídico, a partir de fosfatidilcolina. El ácido araquidónico se metaboliza para formar eicosanoides, principalmente por la ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), y con ellos se promueve la producción de PG y TX; o por lipoxigenasa (LPO), que generan LT y lipoxinas (LX). Las PGE2 y PGI2, causan vasodilatación, y PGE2 también genera hiperalgesia y es considerado un potente inductor de la fiebre. La segunda clase de mediadores lipídicos son los factores activadores de plaquetas, los cuales son generados por la acetilación de ácido lisofosfatídico y activan varios procesos que se producen durante la respuesta inflamatoria, incluyendo el reclutamiento de leucocitos, la vasodilatación y vasoconstricción, así como el aumento de la permeabilidad vascular y activación de plaquetas (Chovatiya & Medzhitov, 2014; Kotas & Medzhitov, 2015; Oliveira et al., 2014).
- Citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, etc.). Las citocinas son productos proteicos que sirven como los mediadores más importantes en el inicio de la respuesta inflamatoria, especialmente TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , ya que son considerados

determinantes fisiopatológicos de la sepsis y shock séptico. Se producen por muchos tipos de células, principalmente por macrófagos y mastocitos. IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$  son producidas por macrófagos activados y tienen en común la capacidad para estimular a hepatocitos para producir proteínas de fase aguda (APP), como son la proteína C reactiva,  $\alpha$ -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína amiloide sérica, etc. En el endotelio las citocinas favorecen la expresión de moléculas de adhesión para monocito y neutrófilos (integrinas, selectinas y adherinas), permitiendo su posterior migración tisular. Además la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , activan las células endoteliales y suministran señales de co-estimulación y mitogénesis a los linfocitos B y T. La IL-6 estimula la secreción de inmunoglobulinas y la proliferación de los linfocitos B (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2018; Oliveira et al., 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

- Moléculas de adhesión. Existen cuatro familias principales de moléculas de adhesión. Las selectinas atraen a neutrófilos y plaquetas hacia el endotelio. Las integrinas hacen que los neutrófilos se aplanen y facilitan su exudación a través de la pared endotelial; son importantes para la transcripción y otras funciones celulares. Las cadherinas favorecen las uniones celulares. Finalmente, las inmunoglobulinas actúan uniéndose a las células (Turner, Nedjai, Hurst, & Pennington, 2014; Yang, Chang, & Wei, 2016).

Los genes que codifican todos estos mediadores están regulados por factores de transcripción proinflamatorios. La activación de estos factores de transcripción está controlada por supresores fisiológicos de la señalización de citocinas (SOCS) y otros

adaptadores intracelulares. Sin embargo, la capacidad de estas señales de “Freno o Apagamiento” fisiológicos está limitada en el tiempo, lo que permite la movilización de factores de transcripción en forma activa al núcleo. Este transporte se lleva a cabo a través de importinas / carioferinas, estas proteínas son esenciales para el acceso al genoma de los factores de transcripción proinflamatorios (Buckley, Gilroy, Serhan, Stockinger, & Tak, 2013; Lawrence & Fong, 2010; Medler & Wajant, 2019).

## **1.2 Respuesta inflamatoria**

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta inflamatoria genera una gran acumulación y activación de células inmunes y no inmunes en el sitio dañado, estos cambios se dan tanto por estímulos internos como externos. Dentro de las células no inmunes que participan en este proceso están, los queratinocitos de la piel, las células epiteliales de las mucosas y las células endoteliales, las cuales actúan como una "barrera" específica de órganos y son los centinelas de primera línea bajo estímulos exógenos y endógenos de inflamación. Las células inmunes como los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y los macrófagos, ubicados en posiciones estratégicas, alertan al sistema inmunológico de la presencia y ubicación de agentes irritantes que causan inflamación y modulan la respuesta inflamatoria (Branco, Yoshikawa, Pietrobon, & Sato, 2018; Ip & Medzhitov, 2015).

A pesar de que existen diferentes células que participan en este proceso los macrófagos y las células endoteliales son considerados un factor constante en el proceso, su participación es continua e independiente al origen de la respuesta inflamatoria.

### 1.2.1 Macrófagos y su activación

Los macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear, derivan de un precursor que es el monocito y tiene como función principal la fagocitosis. Los macrófagos dependiendo de los estímulos que se encuentren en su microambiente pueden polarizarse en dos fenotipos en general: Macrófagos M1 (tipo proinflamatorio) los cuales son importante en la defensa contra patógenos, la fagocitosis, la secreción de citocinas proinflamatorias y moléculas microbidas y macrófagos; Macrófagos M2 (tipo antiinflamatorio) que participan en la regulación de la fase de resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos dañados (Moreira Lopes, Mosser, & Goncalves, 2020).

A diferencia de otras células del sistema inmunológico, tales como los linfocitos B y T, los cuales en condiciones basales se encuentran en quiescencia o reposo y cuya activación siempre conlleva un proceso de expansión clonal caracterizado por una elevada tasa proliferativa, los macrófagos, se encuentran en constante proliferación o bien bajo el proceso de activación de activación ejerciendo funciones específicas (Medzhitov, 2010; Sato & Yanagita, 2018; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Estas células secretan una gran variedad de sustancias, que participan en múltiples procesos biológicos, entre los que se encuentran el crecimiento celular y la citotoxicidad. Dentro los compuestos secretados encontramos: enzimas (por ejemplo, lisozima), metabolitos del oxígeno y del nitrógeno e intermediarios del metabolismo lipídico (por ejemplo, prostaglandinas) citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e IL-6, promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias, principalmente neutrófilos en los puntos de inflamación y son responsables de la mayor parte de los



efectos sistémicos de la inflamación (como por ejemplo, la fiebre). Finalmente, los macrófagos también producen factores de crecimiento para fibroblastos (FGF, TGF- $\beta$ ) y para el endotelio vascular, de manera que se favorece el riego sanguíneo y la reparación de tejidos dañados. Debido a la gran abundancia de este tipo celular, a su distribución, a su motilidad y capacidad de respuesta, los macrófagos son considerados una de las piezas clave en la respuesta inmune e inflamatoria (Decano, Mattson, & Aikawa, 2016; Nathan & Ding, 2010; Oliveira et al., 2014).

En orden cronológico, la respuesta de los macrófagos en el proceso inflamatorio se basa en primera instancia, en la activación de macrófagos para fagocitar y con esto eliminar a la fuente que inicio el proceso inflamatorio. Se genera además una atracción de células inflamatorias a la zona afectada, fundamentalmente un mayor número de macrófagos o de algunas otras células fagocitarias, generando grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno entre los que se encuentran el óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) con la finalidad de eliminar al agente que desencadenó el proceso inflamatorio (Csonka et al., 2015; Feehan & Gilroy, 2019).

En ocasiones la inflamación es persistente, lo cual desencadena una amplificación de la señal y con esto la activación del sistema de complemento, que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), capaz de lisar a las células o microorganismos responsables de iniciar el proceso inflamatorio.

### **1.2.2 Endotelio y su activación**

Por otro lado tenemos a las células endoteliales, estas se encuentran formado una monocapa de células que recubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos,

este se encuentra entre la sangre y los tejidos. Las células endoteliales están funcionalmente relacionadas con las células del sistema inmune, por ejemplo durante las etapas finales del embarazo el endotelio del cordón umbilical se convierte en un centro de maduración hematopoyético. Cuando un tejido se encuentra en condiciones no inflamatorias (reposo), las células del endotelio vascular tienen diferentes funciones como mantener la fluidez de la sangre, regular el flujo sanguíneo, mantener la permeabilidad vascular y controlar los leucocitos circulantes también participan en este proceso regulando la extravasación de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia las zonas de inflamación (Filep, 2013; Jantsch, Binger, Muller, & Titze, 2014; Yang et al., 2016).

El flujo sanguíneo es regulado por el balance de moléculas que controlan las células del músculo liso que rodean el vaso sanguíneo y por la producción de NO que es un potente vasorelajante. La permeabilidad vascular permite regular la salida de proteínas grandes de la sangre al tejido, como albúmina y anticuerpos, mediante modificaciones en uniones estrechas y adherentes entre células endoteliales. Finalmente, las células endoteliales en reposo no interactúan con los leucocitos circulantes, ya que las moléculas de adhesión que disponen, se encuentran secuestradas en vesículas intracelulares conocidas como cuerpos de Weibel-Palade (Chung, Leanderson, Lundberg, & Jonasson, 2017; Cobos-Segarra, Lopez-Jaramillo, Ponte-Negretti Ci, Villar, & Penaherrera, 2018; Li et al., 2017)

Las células endoteliales se pueden activar de dos formas: la activación de tipo I, que es rápida y no depende de la activación de nuevos genes y la activación tipo II, que es lenta y depende de la activación de nuevos genes.

- **La activación endotelial de tipo I** ocurre en los primeros 10 a 20 min y está mediada por la unión de ligandos a sus receptores que se encuentran acoplados a proteína G, lo cual desencadena la catálisis de fosfolípidos de membrana, que producen un aumento de calcio.
- **La activación endotelial de tipo II**, se da después de que los receptores comienzan a perder su sensibilidad, limitando el proceso inflamatorio. Ocurre una activación endotelial persistente o activación tipo II donde actúan dos mediadores principales que provienen principalmente de leucocitos activados: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleucina 1 (IL-1). La interacción de TNF $\alpha$  e IL-1 con sus ligandos, inducen la activación de factores de transcripción como el Factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la Proteína activadora 1 (AP1), que conllevan a la transcripción de nuevos genes y a la traducción de nuevas proteínas. Por lo tanto la respuesta a la activación de tipo II es más tardía y se sostiene el aporte de moléculas que contribuyen al sostenimiento del proceso inflamatorio agudo.

Una vez que las células endoteliales se activan la infiltración de las células inflamatorias sigue una secuencia temporal, donde participan por un lado las sustancias quimiotrópicas endógenas; como C5a, histamina y LT B; y por otro lado sustancias quimiotrópicas exógenas como oligopéptidos iniciados con N-formil-metionina secretado por bacteria. Ambos grupos de moléculas activan a las células endoteliales de los vasos que irrigan la zona inflamada, induciendo la expresión de la molécula de adhesión como selectina P (Chung et al., 2017; Cobos-Segarra et al., 2018; Decano et al., 2016; Li et al., 2017).

Componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), o citocinas como el TNF- $\alpha$  (procedentes de macrófagos que ya han llegado al foco inflamatorio) también son potentes inductores del proceso inflamatorio.

Recientemente se ha descrito que las células endoteliales contribuyen al ambiente proinflamatorio secretando activamente IL-6 e IL-8 así como los ligando de CD2, ICOS (Co-receptor de linfocitos T) 4-1BB, OX40, todos ellos involucrados en la formación y activación de linfocitos T de memoria (Pober & Sessa, 2007). Por todo lo anterior queda claro que las células endoteliales juegan un papel central en el reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo y en la activación y generación de linfocitos T de memoria.

### **1.3 El LPS**

El LPS, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas y es el ejemplo paradigmático de los patrones moleculares de reconocimiento de patógenos (PAMPs) que se unen y activan a la familia de receptores semejantes TOLL.

Desde el punto de vista estructural, el LPS está formado por tres regiones distintas: una región central compuesta por polisacáridos repetitivos, una estructura de tipo antígeno-O, ambas hidrofílicas, y un dominio hidrofóbico formado por seis cadenas de ácidos grasos, también denominado lípido A, que representa el componente biológicamente activo del LPS. Debido a su estructura, el LPS actúa como una molécula anfipática y muy poco soluble en soluciones acuosas (Jones et al., 2016; Kim, Lee, & Jeon, 2015; Tsukamoto, Fukudome, Takao, Tsuneyoshi, & Kimoto, 2010).

En los macrófagos, la activación de TLR4 por LPS induce la síntesis de citocinas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos (factor activador de plaquetas, etc), péptidos quimiotácticos y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La mayor parte de estos productos inducidos por el LPS actúan de forma autocrina sobre los propios macrófagos y algunos de ellos, como por ejemplo, los metabolitos del ácido araquidónico o el IFN- $\gamma$ , controlan la expresión de genes tardíos en el contexto de la respuesta al LPS. Sin embargo, no todos estos productos ejercen un efecto positivo sobre la respuesta de los macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 forma parte de un mecanismo autoinhibidor que controla la producción de otras citocinas como el TNF- $\alpha$  (Bak, Truong, Kang, Jun, & Jeong, 2013; Choodej, Pudhom, & Mitsunaga, 2018; Tsukamoto et al., 2010; Tursi & Elisei, 2019).

Las células endoteliales, al igual que la mayoría de los epitelios, expresan receptores TLR4, que al activarse, inducen la expresión de selectina E la cual se une a algunas glicoproteínas de los neutrófilos y monocitos, de modo que los leucocitos circulantes, al pasar por las zonas donde el endotelio se ha activado, se pegan a la pared del vaso y comienzan un proceso de movimiento llamado "rolling" a lo largo de la misma, sin separarse de ella (Freire & Van Dyke, 2013). A su vez en la superficie de las células endoteliales existen otras moléculas de adhesión denominadas moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que presentan dos ligandos en la superficie leucocitaria, estos son: CD11a/CD18 (también llamado LFA-1) y CD11b/CD18 (el receptor de C3bi conocido como Mac-1). En condiciones normales, la interacción

entre ICAM-1 y sus ligandos presentes en las membranas de los neutrófilos es débil, pero bajo circunstancias inflamatorias, los leucocitos en fase de "rolling" que ya han sido afectados por las sustancias quimiotrópicas (C5a, histamina, leucotrieno B) liberadas en el foco inflamatorio, hacen que se produzca un cambio en la configuración de CD11a/CD18 y de CD11b/CD18 teniendo como consecuencia que su interacción con ICAM-1 sea lo suficientemente fuerte para detenerlos y fijarlos al endotelio (Freire & Van Dyke, 2013; Kotas & Medzhitov, 2015; Medzhitov & Janeway, 2000).

Los leucocitos atrapados por el endotelio activado, ponen en juego otras interacciones entre moléculas de superficie y se abren paso entre las células endoteliales para salir del vaso sanguíneo (principalmente de los capilares), completando un proceso clásicamente conocido como diapédesis. Una vez fuera del vaso, los leucocitos se mueven a favor del gradiente de concentración de los mediadores quimiotácticos, dirigiéndose hacia el foco inflamatorio (Kratofil, Kubes, & Deniset, 2016; Lawrence & Fong, 2010).

### **1.3.1 El LPS como inductor de la vía de NF- $\kappa$ B**

Los macrófagos y las células endoteliales juegan un papel modulador crucial en la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria, ya que contienen una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que como se mencionó antes, reconocen moléculas con patrones moleculares genéricos expresados en la superficie de organismos extraños con la finalidad de eliminarlos. Un ejemplo de estos receptores son los receptores tipo Toll (TLR), los cuales pueden ser activados por diferentes estímulos, entre los que destaca el LPS (Ip & Medzhitov, 2015).

El LPS se une a la proteína de unión al LPS (LBP), la cual cataliza el paso de los agregados de LPS y los transfiere al receptor CD14 que tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2). La MD-2 se asocia con el receptor TLR4. La unión del LPS a la porción externa del receptor TLR4 induce al dominio TIR (dominio citoplasmático con homología al dominio citoplasmático de IL1-R) al unirse y activa a MyD88 (gen de diferenciación mieloide de respuesta primaria). En un extremo MyD88 presenta un dominio TIR a través del cual interacciona con el dominio TIR de TLR4, en el otro extremo posee un dominio muerte (DD). MyD88, a través de este dominio de muerte, interacciona con IRAK (kinasa asociada a IL1-R), la cual inicia una cascada de activación de kinasas activando IKK, el cual fosforila a I $\kappa$ B que en condiciones basales, secuestra a el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, inactivándolo. Una vez en el núcleo activa la transcripción de genes que están implicados en la respuesta inflamatoria inducida por LPS (TNF- $\alpha$ , IL1  $\beta$ , IL6, COX-2, V-CAM e I-CAM). Por lo tanto, la activación del NF- $\kappa$ B es un proceso fundamental en el desarrollo de la inflamación (Buckley et al., 2013; Cho et al., 2013; Medzhitov & Horng, 2009; Tsukamoto et al., 2010).

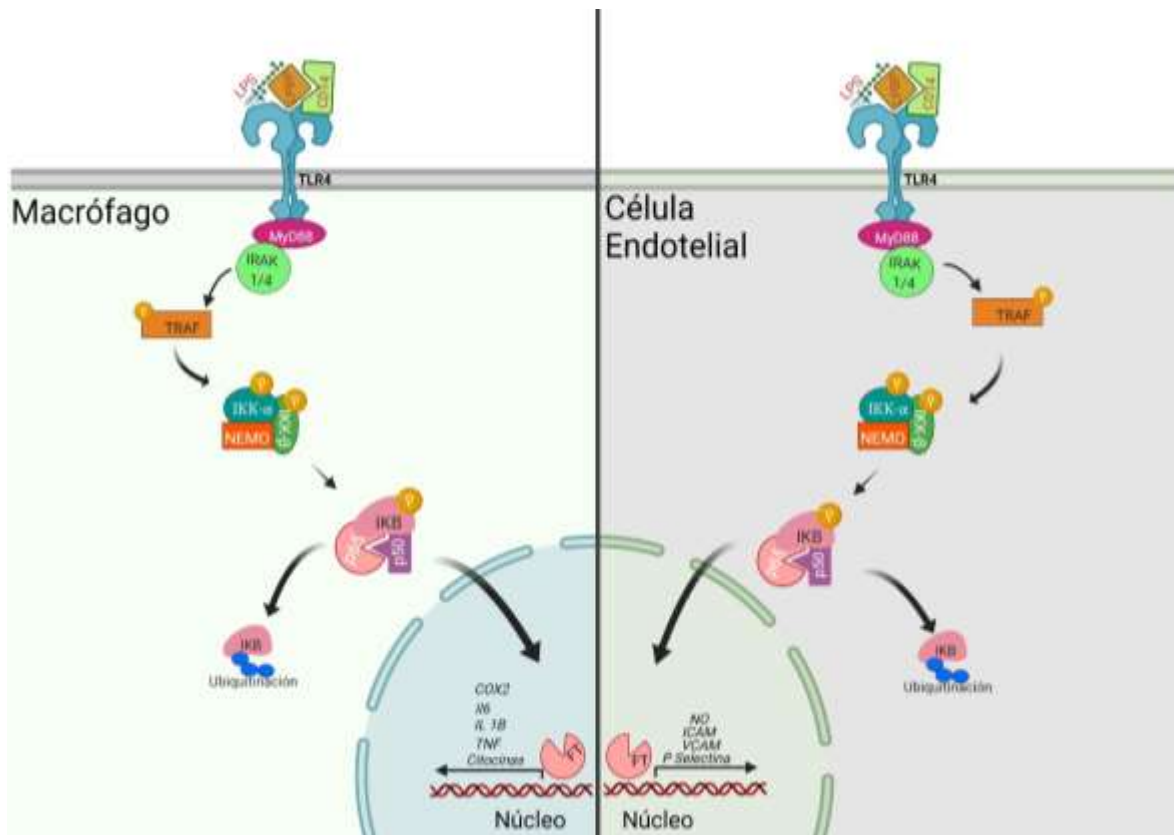
### **1.3.2 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B)**

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción nuclear que está particularmente preparado para la defensa en aquellas condiciones que atenten contra la homeostasis de un sistema biológico, como son las infecciones virales y bacterianas o por algún tipo de estrés físico (Lawrence & Fong, 2010). En el tejido crónicamente inflamado, en el que los estímulos patogénicos externos parecen estar ausentes, TNF- $\alpha$  e IL-1 actúan como inductores endógenos primarios de NF- $\kappa$ B. Cuando las células son expuestas tanto

a estímulos externos, como es el caso del LPS, o estímulos internos como TNF- $\alpha$  e IL-1, una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de sus inhibidores, por lo que NF- $\kappa$ B es liberado para entrar en el núcleo y activar la expresión de genes. Estos complejos citoplasmáticos que son capaces de efectuar una translocación nuclear 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. Muchos miembros de esta familia (con excepción de RelB) pueden homodimerizarse, así como formar heterodímeros entre ellos. 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 genes (Chae, 2018; Du, Sun, & Hu, 2018; Fritsche, 2015).

La expresión de proteínas de NF- $\kappa$ B puede proveer especificidad por sitios y eventos en respuesta a estímulos particulares. Las proteínas p50 y p65 desempeñan un papel fundamental en la producción constitutiva de IL-6 en los fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide, mientras la activación de p65 por trombina regula la expresión de ICAM-1 en células endoteliales. Los heterodímeros p50 y p65 están íntimamente involucrados en la activación de genes proinflamatorios por IL-1 o TNF- $\alpha$  en monocitos humanos, y estos efectos son bloqueados por la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Kotas & Medzhitov, 2015). Estas diferencias, junto a múltiples variaciones en los sitios de enlace semejantes a NF- $\kappa$ B que interactúan con ciertos hetero y homodímeros NF- $\kappa$ Bs, permiten a las células responder al ambiente externo en el tiempo apropiado y con los genes correctos.





**Figura 1.** Vía de señalización de NF-κB activada por LPS en macrófagos y en células endoteliales.

NF-κB existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada a proteínas reguladoras llamadas inhibidores de κB (IκB), de los cuales los más importantes pueden ser IκBα, IκBβ, e IκBε que contienen múltiples repeticiones de ankirina las cuales interactúan con los dominios de localización nuclear de las proteínas de la familia Rel (Rel Homolog Domain; RHD) previo a su translocación. Los IκBs mejor estudiados son el α y el β, ambos se fosforilan en respuesta a diferentes estímulos en los residuos de serinas: S32 y S36. En casi todos los tipos celulares donde se ha probado, tanto el TNF-α, LPS, el PMA y la IL-1β, inducen una rápida y completa

degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  desde los 5 min. Sin embargo, la ausencia de I $\kappa$ B- $\alpha$  es transitoria ya que 1 h después de haber sido degradada aparecen nuevamente niveles detectables de proteína. 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 IKK-1 e IKK-2, respectivamente), y la subunidad reguladora IKK- $\gamma$  (NEMO). La activación de IKK inicia con la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en NH<sub>2</sub>- terminales específicos de residuos de serina. I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado es 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- $\kappa$ Bs se translocan al núcleo, donde se unen a elementos específicos en las regiones promotoras de los genes diana para activar así la expresión génica. Posteriormente IKK también fosforila I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  para su degradación (Jain, Dhingra, Narsinghani, & Sharma, 2016; Lawrence, 2009; Lawrence & Fong, 2010).

La activación de NF- $\kappa$ B incrementa la expresión de moléculas de adhesión, E selectina, VCAM-1, e ICAM-1, mientras la inhibición de NF- $\kappa$ B reduce la adhesión y trans migración de leucocitos. Sin embargo, este factor de transcripción participa en otros procesos biológicos como en la inducción o inhibición de la apoptosis (Chovatiya & Medzhitov, 2014).

NF- $\kappa$ B es altamente activado en sitios de inflamación en diversas enfermedades y puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-8, quimiocinas, ICAM, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), COX-2 y activa a la iNOS. Por ejemplo, en artritis reumatoide, NF- $\kappa$ B es sobre-expresado en

la membrana sinovial inflamada y su actividad puede aumentar el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de mediadores proinflamatorios tales como IL-1, IL-6, IL-8, y TNF- $\alpha$  (Feehan & Gilroy, 2019; Lawrence & Fong, 2010; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

#### **1.4 Enfermedades crónicas caracterizadas por presentar procesos inflamatorios.**

Las enfermedades crónicas son la principal causa de mortalidad en el mundo y representan aproximadamente el 60% de todas las muertes. Se sabe que varios biomarcadores inflamatorios se alteran en enfermedades crónicas. Tal es el caso de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, sus productos de transcripción como las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) y enzimas como COX-2, MMP-9, moléculas de adhesión celular (CAM), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), etc (Feehan & Gilroy, 2019; Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Singh et al., 2019).

El cáncer es una de las principales enfermedades influenciadas por la inflamación crónica, ya que se sabe que, la respuesta inflamatoria ayuda positivamente en el desarrollo del tumor, actuando como un proceso de promoción y aumentando así el riesgo de malignidad. Aproximadamente el 15% de los casos de cáncer están asociados a una infección persistente y una inflamación crónica. Se ha establecido que el sistema NF- $\kappa$ B se encuentra activo constitutivamente en varios tipos de cánceres, como cáncer de mama, colon, hígado, pulmón, páncreas, etc. Se ha observado que en respuesta a carcinógenos como el tabaco, el alcohol y la exposición a la radiación y otros se encuentra una activación permanente de esta

vía. NF-κB activa posteriormente cientos de productos génicos proinflamatorios, incluidos TNF-α, IL-1, IL-6, quimiocinas, MMP-9, 5-LOX, VEGF y COX-2. La activación de NF-κB también conduce a radiorresistencia y quimiorresistencia. Estas observaciones sugieren que NF-κB juega un papel importante en la inflamación y el cáncer (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Singh et al., 2019).

Otra enfermedad crónica inducida por inflamación es la artritis reumatoide (AR), que es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de la citocina proinflamatoria IL-17. Los estudios sugirieron que las citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α también desempeñan funciones patológicas en el desarrollo de la AR (Shen, Abu-Amer, O'Keefe, & McAlinden, 2017; Yang et al., 2016).

En la enfermedad de Alzheimer (EA), que es la enfermedad neurodegenerativa crónica prevalente, la inflamación tiene un papel esencial en la patogénesis de la enfermedad. La evidencia acumulada ha demostrado que el depósito de beta amiloide extracelular en la EA conduce a una regulación positiva de los mediadores proinflamatorios IL-1β, IL-6 y TNF-α, por parte de las células inmunitarias activadas, que promueven vías inflamatorias adicionales a través de la instigación de COX -2 y NF-κB (Forloni & Balducci, 2018; Heppner, Ransohoff, & Becher, 2015).

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de trastornos inflamatorios del tracto digestivo, que incluye principalmente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Los mediadores inflamatorios, incluidas las citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17 e IL-21), los eicosanoides y los metabolitos reactivos del oxígeno, desempeñan un papel vital en la causa de la enfermedad inflamatoria crónica en la EII Además, la

activación de la vía de señalización STAT3 se asocia con colitis y cáncer colorrecta (Oliveira et al., 2014; Rea et al., 2018).

El asma alérgica es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias causada por la exposición a alérgenos que provocan broncoconstricción. El asma se caracteriza por un desequilibrio entre Th1 y Th2 y una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Las células Th2 liberan varias citocinas, como IL-4 e IL-13, que a su vez producen inmunoglobulina, IgE, lo que da lugar a una respuesta alérgica. Numerosos estudios también indican que la atenuación de la vía inflamatoria de tipo 2 provocó una reducción clínicamente sustancial de las exacerbaciones del asma. Por tanto, ah es evidente que la inflamación de tipo 2 es un mecanismo imperativo de susceptibilidad a la exacerbación del asma(Siczek et al., 2016; Tak & Firestein, 2001; Zhang & Chen, 2017).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica que afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo. La DM tipo 1 es inducida por la inflamación crónica de los islotes pancreáticos, mientras que la DM tipo 2 se asocia con resistencia a la insulina, lo que resulta en una producción elevada de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los pacientes con diabetes tipo 2 tienen una mayor probabilidad de desarrollar aterosclerosis, que es una enfermedad en la que la placa se acumula en las arterias. Los eicosanoides derivados del ácido araquidónico como la prostaglandina E 2 (PGE 2) y el leucotrieno B4 (LTB4) son los mediadores proinflamatorios potenciales en la aterosclerosis y están regulados por NF- $\kappa$ B (Tornatore, Thotakura, Bennett, Moretti, & Franzoso, 2012; Tursi & Elisei, 2019).

En conjunto, es evidente que la desregulación de las vías inflamatorias es el mecanismo subyacente de diversas enfermedades crónicas. Es por eso que, se han desarrollado muchos fármacos que se dirigen a las vías inflamatorias para el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, la mayoría de estos medicamentos desarrollados hasta ahora son muy costosos y no están exentos de efectos secundarios adversos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar medicamentos seguros, asequibles y eficaces para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades crónicas.

### **1.5 Modelos de evaluación de la actividad antiinflamatoria**

Existen diversos modelos experimentales que se utilizan para el estudio de principios activos con propiedades antiinflamatorias los cuales se pueden desarrollar tanto *in vivo* o *in vitro*. En la mayoría de los modelos *in vivo* se utilizan sustancias irritantes como el TPA (13-cetato de 1-12-O-tetradecanoilforbol), carragenina y aceite de croton, los cuales inducen un efecto inflamatorio local y favorecen el incremento de la enzima mieloperoxidasa (MPO) teniendo como resultado la generación de un edema. En estos modelos la inhibición del edema es el parámetro que indica el efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa (Khan et al., 2012; Rakariyatham et al., 2019). En los modelos *in vitro* se utilizan células fagocíticas, principalmente macrófagos, ya que estos responden a una variedad de estímulos de membrana (principalmente LPS) liberando diferentes mediadores proinflamatorios (citocinas, ROS, NOS, prostaglandinas, entre otros). Lo que se busca en este modelo es disminuir los mediadores proinflamatorios inducidos por la estimulación con LPS (Abiodun et al., 2016; Kwon, 2016)

### **1.5.1 Modelo de edema en oreja inducido por TPA**

Los modelos de evaluación antiinflamatoria varían en la intensidad de la reacción, se pueden generar modelos de inflamación aguda, subcrónica ó crónica.

Dentro de los modelos de inflamación aguda encontramos el modelo de edema auricular en ratón inducido por el TPA, posee propiedades irritantes, produciendo una inflamación prolongada, intensa y bifásica en la epidermis (F. Siddiqui et al., 2016; Theoduloz et al., 2015).

La primera fase está caracterizada por el edema de la dermis y el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$ . Debido a su estereoquímica como análogo conformacional del diacilglicerol, el TPA desencadena varios eventos vinculados con la activación de la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio, lo cual lleva a la activación de la PLA2 y a la liberación de ácido araquidónico el cual es el precursor de las PG. Además activa factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP1, que llevan a cabo la expresión de citocinas proinflamatorias (R. Garg, Ramchandani, & Maru, 2008; Passos et al., 2013).

En la segunda fase se observa una inducción de la enzima COX-2. Se ha reportado que el TPA induce una respuesta inflamatoria de larga duración en comparación con el ácido araquidónico, asociada con la acumulación de macrófagos y de células PMN (basófilos, neutrófilos, eosinófilos), así como la producción de eicosanoides tales como el receptor de LTB4 y la PGE2 bloqueada por AINEs e inhibidores de la 5-LO, con un aumento en la permeabilidad vascular e infiltración de neutrófilos. Así mismo se observa un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa en los sitios de

aplicación e inducción de la iNOS entre otros eventos (Castro, Ocampo, & Franco, 2014; Cervini-Silva et al., 2013)

Como resultado se desencadenan todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, y eritema, extravasación y edema. A nivel histológico, se produce: agregación plaquetaria, agregación y adherencia de compuestos PMN, migración a la dermis y desgranulación de mastocitos. A nivel bioquímico, en minutos y hasta varias horas después, se elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y las PGs E1, E2 y F2 (Huang et al., 2011; Park, Jin, Choi, Byun, & Jeong, 2011).

### **1.5.2 Modelo de estimulación de macrófagos con LPS**

Dado que las células fagocíticas, tales como los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y principalmente los macrófagos, responden a una variedad de estímulos de membrana son considerados importantes moduladores de la iniciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria. Además, por su capacidad para sintetizar mediadores biológicos, como citocinas prostaglandinas y ROS, son muy utilizados como modelos de inflamación *in vitro*.

Éstas células son estimuladas con LPS, un fosfoglicolípido que se encuentra inmerso a la membrana bacteriana (lípidos A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico (esta región es la que confiere actividad biológica a la molécula). Este a su vez comprende dos regiones: la cadena *O-específica* también llamada *antígeno O*, formada por unidades repetitivas de oligosacárido; y el *core*, que a su vez se subdivide en *core externo* (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el *core interno* (formado por heptosas) (Brandenburg K, 2016). El lípido



A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico) (Tsukamoto et al., 2010).

Una vez que el LPS se une a sus receptores se inicia la cascada de señalización que tiene como finalidad la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y con estos llevar a cabo la transcripción de genes que están implicados en la respuesta inflamatoria como TNF- $\alpha$ , IL1  $\beta$ , IL6, COX-2, ROS, moléculas de adhesión (Ip & Medzhitov, 2015; Medzhitov & Horng, 2009; Palsson-McDermott & O'Neill, 2004; Tsukamoto et al., 2010).

### **1.5 Tratamientos farmacológicos para la inflamación.**

Las enfermedades inflamatorias se tratan con medicamentos antiinflamatorios convencionales, los cuales tienen su acción farmacológica principalmente bloqueando la acción de moléculas mediadoras de la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria. En la actualidad existen un gran número de fármacos empleados para tratar los procesos inflamatorios agudos y crónicos. Estos se clasifican en antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINES) (Cheekavolu & Muniappan, 2016). Los antiinflamatorios más importantes son los glucocorticoides (cortisol, cortisona, prednisolona y dexametasona). Actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales son activados formando un complejo cortisol-receptor glucocorticoide el cual interacciona con el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, y migran al núcleo induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria y también se sabe que tienen efectos post-transcripcionales y disminuyen la estabilidad de algunos ARNm

proinflamatorios (Bak et al., 2013; Barnes, 2016) Los efectos de estos esteroides son el resultado de la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas proinflamatorias, como IL-12, TNF- $\alpha$  y prostaglandinas (Hoppstadter et al., 2016).

Los AINEs constituyen un grupo de sustancias químicamente heterogéneo que favorecen el aumento de permeabilidad vascular y la quimiotaxis de los neutrófilos en la reacción inflamatoria. Entre ellos encontramos al ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno, la indometacina, el piroxicam, el rofecoxib y el celecoxib, entre otros involucrados en el control terapéutico de la inflamación, con propiedades analgésicas y antipiréticas. Los AINEs son un grupo amplio de fármacos que tienen como característica principal inducir, analgesia, antipiresis y desinflamación, sin embargo el potencial terapéutico para cada una de estas propiedades no es el mismo entre ellos. Así, podremos encontrar un AINE con mayor efecto analgésico que otro, pero con mayor efecto antipirético. Uno de los fármacos más utilizados es la indometacina, la cual es conocida como un agente antiinflamatorio no esteroideo con actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética (Kwon, 2016; Lee, Kim, & Han, 2013). El mecanismo principal de estos medicamentos es la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, que inducen la síntesis de PG y TX, esto lo hacen compitiendo con el AA por el sitio activo. Cada AINE presenta un modo de inhibición, que se puede incluir dentro de tres modos de inhibición generales: (a) unión rápida y de forma reversible (ej. ibuprofeno, ácido mefenámico, ácido flufenámico, piroxicam, naproxeno); (b) unión reversible y rápida con baja afinidad seguida de unión, dependiente de tiempo, reversible y lenta (pseudoirreversible), produciendo un cambio conformacional en la proteína (ej. flurbiprofeno, indometacina,

diclofenaco, ácido meclofenámico) y (c) unión rápida y reversible seguida de modificación covalente (ej. unión de la aspirina por acetilación del residuo Ser530 (Andreas et al., 2009; Woodward et al., 2016; Wyns, Plessers, De Backer, Meyer, & Croubels, 2015)

Existen AINEs selectivos para la COX-2 y algunos estudios muestran que COX-2, es la causante de los efectos proinflamatorios, debido a la expresión de esta en células que participan en la respuesta inflamatoria, como macrófagos y monocitos. Por otro lado, se ha visto que la inhibición de la COX-1 produce lesión del conducto gastrointestinal, hemorragias en el estómago, disfunción plaquetaria y carece de efectos antiinflamatorios importantes. Los AINEs selectivos de COX-2 normalmente presentan en su estructura un grupo sulfonamida, metilsulfóxido o tioéter, que en la mayoría de los casos interaccionan con el residuo Arg 513 o Arg120 que se encuentran en el sitio hidrofóbico de COX-2, produciendo un cambio conformacional que tienen como resultado la inhibición de la enzima (Liu, Moon, Jenkins, Sims, & Gross, 2016; Simpson et al., 2015; Thompson et al., 2016).

La mayoría de los antiinflamatorios causan efectos adversos asociados aun consumo por largos periodos. En el caso de los AINEs la mayoría de los efectos adversos se deben a que no son selectivos de COX-2, los más comunes son: náuseas, dolor abdominal, pirosis, dispepsia, mareos, cefalea y somnolencia (Lon, Liu, & Jusko, 2012). Los efectos adversos de los antiinflamatorios esteroideos son más severos en comparación con los AINEs, entre ellos encontramos efectos sobre la piel (deterioro de piel ó acné), aumento de peso, un mayor riesgo de infecciones (debido a la disminución de la inmunidad), trastornos de la visión (cataratas; después de tratamientos largos y tomados durante varios meses o años), problemas digestivos

(incluyendo úlceras), aparición o aumento de la hipertensión, descompensación psiquiátrica (hiperexcitación y depresión), entre otros. (Bahl et al., 2014; Huang et al., 2011). Debido a que el uso crónico de AINES trae como consecuencia efectos indeseables, la población que padece de enfermedades inflamatorias crónicas recurre a la medicina tradicional como alternativa para controlar la inflamación. Por esta razón las plantas medicinales presentan una fuente importante para la búsqueda de nuevos fármacos los cuales puedan ser selectivos y con ello aminorar la aparición de efectos adversos.

### **1.5.1 Medicina tradicional utilizada en la inflamación.**

Según la organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional es la suma de conocimientos, técnicas y prácticas, basadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, que se utilizan para mantener la salud prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.

Una planta medicinal se puede definir como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que son empleadas para el tratamiento tradicional de enfermedades. Actualmente se sabe que las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, y aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de las plantas medicinales, la OMS ha estimado que cerca del 65-80% de la población mundial recurre principalmente a la medicina tradicional para la atención primaria de su salud, siendo la herbolaria una de las prácticas más recurrida (Nonnenmacher & Hiller, 2018; Staniek et al., 2013; Tursi & Elisei, 2019).

Actualmente se conocen un gran número de especies con actividad terapéutica. En México y otros países, éstas forman parte integral de la rica tradición de la cultura popular, también es importante mencionar que varios de los compuestos aislados de las plantas han servido como base para fabricación de diversos fármacos que ya se encuentran en el mercado. La gran diversidad botánica de Mesoamérica se refleja en que, sólo en México, existen cerca de 21600 especies de plantas vasculares, de las cuales más de 3350 son consideradas como plantas medicinales. Sin embargo, a pesar de su riqueza y variedad, sólo un pequeño porcentaje de las plantas medicinales mexicanas han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico (Alves-Silva, Monica, Carla, Ligia, & Henrique, 2016; Arulselvan et al., 2016). Además, la caracterización de los principios activos permite purificar los compuestos presentes en las plantas y descartar en los estudios con modelos in vivo o in vitro, aquellos que pudieran ser tóxicos o generar efectos adversos. En este sentido, los estudios de productos naturales con actividad antiinflamatoria están dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes que no presenten los efectos adversos mencionados anteriormente y a la producción de derivados sintéticos con actividad mejorada (Balunas & Kinghorn, 2005; Gautam, Jachak, & Saklani, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Complejo matarique

Algunas plantas medicinales se agrupan para su reconocimiento en complejos. Un complejo se define como un conjunto de especies de plantas que comparten nombres en común, características morfológicas y/o aromáticas, así como el uso terapéutico en la medicina tradicional (Linares & Bye, 1987). El complejo permite explorar las bases etnobotánicas para entender cómo la gente reconoce aprovecha y maneja las plantas dependiendo de sus necesidades.

El complejo matarique lo conforman especies de la familia Asteraceae nativas de México y Estados Unidos. Éstas son: *Psacalium decompositum*, *Psacalium sinuatum*, *Psacalium radulifolium* y *Psacalium peltatum*. Todas estas especies se utilizan principalmente como remedio para diabetes, pero también para reumatismo, enfermedades gastrointestinales y enfermedades del riñón. A pesar de que las especies que conforman ese complejo se utilizan para los mismos padecimientos, *Psacalium decompositum* es considerada una de las más importantes, ya que además de utilizarse en su ámbito natural, también se comercializa en mercados y es considerada como la especie más efectiva del complejo en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente (Alarcon-Aguilar, Jimenez-Estrada, Reyes-Chilpa, Gonzalez-Paredes, et al., 2000; Alarcon-Aguilar et al., 1997).

#### 2.1.1 *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell

*Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell perteneciente a la familia Asteraceae, es una hierba silvestre de los pinares del noroeste de México, comúnmente conocida como “matarique”, llega a medir entre 30 cm a 1.6 m de altura,

su inflorescencia posee de 10 a 24 flores, con péndulos de hasta 2 cm de largo. Las flores son hermafroditas, corola simpétala, de color crema a café, posee un rizoma fibroso y grueso (Figura 2) (Linares & Bye, 1987). Es utilizada localmente por el pueblo Raramuri y campesinos del Estado de Chihuahua como remedio en la medicina popular. Es utilizada en una decocción de raíces y rizoma para el tratamiento de trastornos reumáticos, dolores, cólicos hepáticos y renales, neuralgias, úlceras y resfriados. Además, las raíces machacadas se utilizan en mordeduras de víbora y la infusión de las raíces como antiséptico en heridas (Anaya, Hernandez-Bautista, Torres-Barragan, Leon-Cantero, & Jimenez-Estrada, 1996).

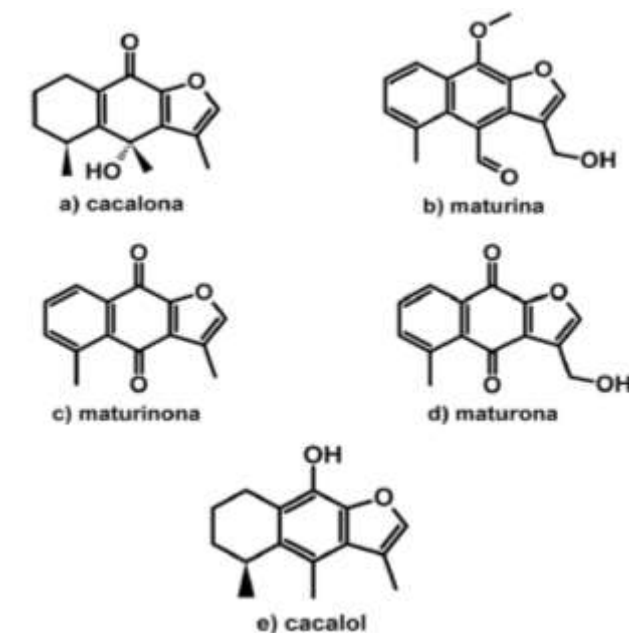
Su clasificación taxonómica es:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Subclase: Asteridae
- Orden: Asteterales
- Familia: Asteraceae
- Género: *Psacalium*
- Especie: *Psacalium decompositm* (Gray) H.E. Robins & Brettell
- Nombre común: Matarique
- Sinonimia: *Cacalia decomposita* A. Gray, *Mesadenia decomposita* (A. Gray), *Odontotric decompositum* (A. Gray) Rydberg.



**Figura 2.** A) Hojas, B) Flores y C) Raíces de *Psacalium decompositum* (Alexander, 2006)

Estudios fitoquímicos de las raíces y el rizoma de *P. decompositum* permitieron la identificación de sesquiterpenoides como cacalol, cacalona, epicacalona, maturina, maturona, 3-hidroxicacalolida, epi-3-hidroxicacalolida (Figura 3). Por medio estos estudios también se observó que uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto hexánico es el cacalol (Correa 1966).



**Figura 3.** Sesquiterpenos mayoritarios aislados de las raíces de *P. decompositum*.



### **2.1.2 Pruebas biológicas y compuestos de *Psacalium decompositum*.**

Con respecto a los estudios dirigidos para determinar los constituyentes químicos de las raíces de *Psacalium decompositum* se han utilizado extractos de diferente polaridad, desde los más polares como el extracto acuoso hasta los menos polares como es el extracto con éter de petróleo. Del extracto hexánico se han aislado y caracterizado más de diez compuestos, siendo el cacalol, la cacalona, la maturina, la maturinona y la maturona los sesquiterpenos más abundantes (Alarcon-Aguilar, Jimenez-Estrada, Reyes-Chilpa, & Roman-Ramos, 2000; Anaya et al., 1996)

Las primeras pruebas biológicas de *Psacalium decompositum* fueron para determinar si tenía actividad fungicida y antimicrobiana. Para observar su actividad fúngica se utilizó el extracto acuoso de las raíces, el cual presentó actividad contra hongos fitopatógenos, principalmente contra *Alternaria*, *Pythium*, *Fusarium* y *Helminthosporium*, siendo un herbicida y fungicida selectivo natural (Anaya et al., 1996).

Para observar su actividad antimicrobiana se utilizaron extractos metanólico, hexánico y de acetato de etilo de las raíz utilizando el método de antibiograma, en donde se observó que los extractos tiene efectos sobre bacterias como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Jiménez-Estada, 1992).

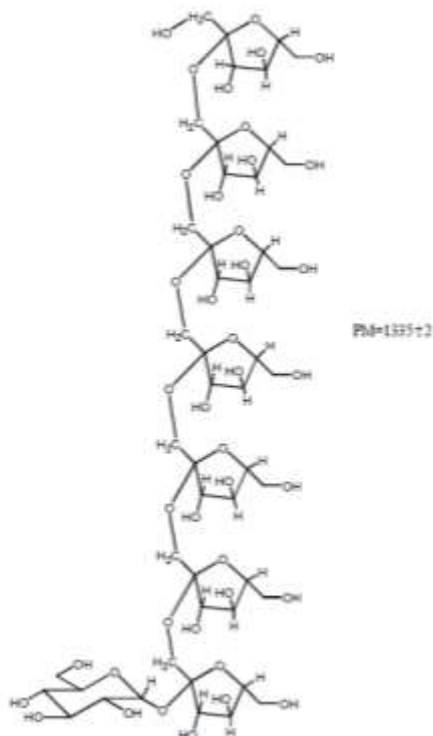
En 2009 se determinó que el cacalol, la cacalona y el acetato de cacalol bloquean los canales de potasio dependientes de ATP de manera similar a la glibenclamida en la aorta de rata estimuladas con diazóxido (Campos, Oropeza, Torres-Sosa, Jimenez-Estrada, & Reyes-Chilpa, 2009). Entre otros estudios se demostró que el

cacalol inhibe la desgranulación de los mastocitos activada por FcεRI *in vitro*, esto a través de la interferencia de la movilización de calcio intracelular (Castillo-Arellano et al., 2018).

En los últimos años los estudios de *Psacalium decompositum* han estado dirigidos a su efecto hipoglucemiante. Las propiedades hipoglucemiantes han sido ampliamente estudiadas utilizando extractos acuosos de la raíces de *Psacalium decompositum* en ratones de la cepa C57BL-6J también ratones CD-1 normoglucémicos y con diabetes experimental, así como en conejos temporalmente hiperglucémicos, en donde ha tenido una buena actividad antihiperglucemiante o hipoglucemiante (Alarcon-Aguilar, Jimenez-Estrada, Reyes-Chilpa, & Roman-Ramos, 2000; Alarcon-Aguilar et al., 1997). Además de extractos acuosos liofilizados se han obtenido fracciones de ricas en polisacáridos tipo fructano (siete unidades de fructosa y una de glucosa) conocidas como fracciones ricas en fructooligosacáridos (FOS) (Figura 4) las cuales redujeron significativamente la glucosa en sangre en ayunas en ratones con diabéticos, lo que sugiere que esta fracción es la responsable de los efectos hipoglucémicos observados (Jimenez-Estrada et al., 2011). Recientemente, se demostró que el tratamiento esta fracción también reduce significativamente los niveles de colesterol, triglicéridos, así como una disminución del peso corporal, también disminuyó los niveles de IL-6, IFN-γ, MCP-1, IL-1β y VEGF en un modelo de síndrome metabólico en rata (Merino-Aguilar et al., 2014).

Mientras que las propiedades antimicrobianas, fungicidas e hipoglucemiantes de las raíces de *Psacalium decompositum* han sido ampliamente estudiadas, no ha sido así para su propiedad antiinflamatoria, la cual no ha sido investigada con

profundidad. Existe un reporte *in vivo* donde el extracto hexánico de *Psacalium decompositum* así como el cacalol y la cacalona fueron probados en dos modelos de inflamación en rata (edema subplantar inducida por carragenina y edema auricular inducido por TPA) observándose una clara inhibición del edema en ambos modelos (Jimenez-Estrada et al., 2006). Sin embargo, aún no se describe el mecanismo farmacológico por el cual *Psacalium decompositum* ejerce efecto antiinflamatorio.



**Figura 4.** Estructura de la fructana, compuesto aislado de las raíces de *P. decompositum*.

**Tabla 1.** Antecedentes de *P. decompositum*.

AÑO	EXTRACTO	SE ENCONTRÓ:	REFERENCIA
1992	Metanólico, hexánico y acetato de etilo	Efecto bactericida	Jiménez- Estrada M et al., 1992.
1996	Acuoso	Actividad de herbicida y fungicida.	Anaya A et al., 1996.
2000	Hexánico	Se aislaron y caracterizado más de diez compuestos, siendo el cacalol, la cacalona, la maturina, la maturinona y la maturona los sesquiterpenos más abundantes	Alarcón- Aguilar J et al., 2000.
2000	Acuoso	Actividad hipoglucemiante.	Alarcón- Aguilar J et al., 2000.
2006	Hexánico	El cacalol y la cacalona tienen un efecto antiinflamatorio en modelos de carragenina y TPA.	Jiménez-Estrada et al., 2006
2009	Hexánico	El cacalol, la cacalona y el acetato de cacalol bloquean los canales de potasio dependientes de ATP en la aorta de rata estimuladas con diazóxido	Campos, Oropeza et al., 2009.
2011	Acuoso	Se aisló una fracción rica en fructooligosacáridos (FOS) con efectos hipoglucémicos.	Jiménez-Estrada et al., 2011.
2014	Acuoso	La fracción FOS redujo los niveles de colesterol, triglicéridos, así como una disminución del peso corporal, IL-6, IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ y VEGF en un modelo de síndrome metabólico en rata.	Merino-Aguilar et al., 2014
2018	Hexánico	El cacalol inhibe la desgranulación de los mastocitos activada por Fc $\epsilon$ RI <i>in vitro</i> , esto a través de la interferencia de la movilización de calcio intracelular.	Castillo-Arellano et al., 2018.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades caracterizadas por un proceso inflamatorio conllevan un gran impacto social, económico y en la calidad de vida de quienes las padecen. Las enfermedades que pasan por procesos inflamatorios agudos o crónicos se agravan cada vez más por el uso excesivo de opiáceos para el dolor inflamatorio, la discapacidad duradera y el deterioro cognitivo de sus víctimas. Es por eso que reducir el alcance y la duración de la inflamación causada por factores microbianos, autoinmunes, constitutivos, alérgicos, metabólicos y físicos afectará de manera beneficiosa la calidad de vida, la economía y la longevidad de la población mundial.

Desafortunadamente los agentes antiinflamatorios de uso clínico para el tratamiento de la inflamación pueden presentar diferentes efectos adversos como náuseas, vómitos, lesiones del tubo digestivo hasta inmunosupresión. La búsqueda de nuevos antiinflamatorios con mecanismos acción distintos permitía desarrollar nuevos compuestos con diferentes efectos adversos (Filep, 2013). Esto representa un motivo muy importante para la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios.

En este sentido, las plantas medicinales son una fuente potencial para el descubrimiento de dichos compuestos y su estudio permitirá validar con métodos científicos el uso de la planta en la medicina tradicional mexicana. Es conocido que las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios como son los flavonoides, glucosidos, fenoles y terpenos. En este sentido los terpenos son la clase más abundante y extendida de compuestos que se han asociado con múltiples actividades farmacológicas, como antioxidantes antiproliferativos, antiinflamatorios, e incluso se han asociado con la capacidad de modular las vías de señalización

celular implicadas en la inflamación. Incluso hay reportes de que pueden actuar como inhibidores de NF- $\kappa$ B (Arulselvan et al., 2016; N. Garg et al., 2017).

Un ejemplo de estas plantas es *Psacalium decompositum* a partir de la cual se han aislados diversos compuestos sesquiterpénicos como el cacalol del cual se ha descrito que tiene efecto antiinflamatorio por inhibición del edema en los modelos de carragenina y TPA (Jimenez-Estrada et al., 2006). Se ha informado que la forma acetilada de este compuesto (acetato de cacalol) es la más estable, aunque se desconoce el efecto antiinflamatorio de este derivado y su influencia en la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar al acetato de cacalol (CA) como un posible modulador sobre la vía de señalización NF- $\kappa$ B, tras la activación inducida por LPS de macrófagos RAW 264.7 y células HUVEC.

#### **4. HIPÓTESIS**

El efecto del acetato de cacalol puede regular cambios en la vía de activación de NF- $\kappa$ B, y en la síntesis de las citocinas inflamatorias, COX-2 y óxido nítrico en diferentes tipos celulares *in vitro*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la acción del acetato de cacalol sobre la vía de señalización de NF- $\kappa$ B así como en la producción de mediadores inflamatorios.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la acción del acetato de cacalol sobre la vía de NF- $\kappa$ B y sus inhibidores en macrófagos y células endoteliales en cultivo estimulados por LPS.
- Determinar el efecto del acetato de cacalol mediante la producción y liberación de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), en cultivo de macrófagos estimulados por LPS.
- Determinar el efecto del acetato de cacalol mediante la producción y actividad de COX-2 en macrófagos estimulados por LPS.
- Determinar el efecto del acetato de cacalol mediante la producción de NO y sobre la producción de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) en células endoteliales estimulados por LPS.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO**

### **7.1 Material vegetal.**

Las raíces de la planta fueron proporcionadas por el Dr. Jiménez Estrada del Instituto de Química de la UNAM, las cuales fueron colectadas en la localidad de Norogachi, ubicada en el municipio de Guachochi, Chih., siendo sus coordenadas geográficas 27°16'25" latitud norte, 107°07'56" longitud oeste y una altitud de 2,131 m s.n.m en el mes de marzo del 2015. La identificación taxonómica de la planta fue determinada empleando claves taxonómicas y comparándola con ejemplares localizados en el herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (Herbario IMSSM, No. 11489).

### **7.2 Obtención de los extractos de la raíz de *Psacalium decompositum*.**

La raíz de *P. decompositum* (500 g) se secó y se fragmento para posteriormente macerarla a temperatura ambiente con hexano (4 L/ 24 h / 5 veces) con el fin de extraer los compuestos menos polares (sesquiterpenos), todo esto en una campana de flujo laminar. El monitoreo de las maceraciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas cromatografías recubiertas de gel sílice 60 (ALUGRAM SIL G/UV<sub>264</sub> MACHEREY-NAGEL) de 0.20 mm de espesor, se visualizaron con luz UV con longitud de onda 254 nm y 356 nm y se revelaron por aspersion con una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, seguido de un calentamiento hasta visualizar los compuestos.

#### **7.2.1 Obtención de cacalol**

Se tomaron 3.5 g del extracto hexánico y se disolvieron en 5 mL de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), se le añadieron 3 g de gel sílice y se eliminó el disolvente con agitación



contante hasta que se obtuvo un polvo y posteriormente se separó por cromatografía de columna abierta (CCA).

La columna se empacó utilizando 30 g de gel de sílice (previamente mezclada con hexano) con un tamaño de malla de 70-230 como fase estacionaria, en una columna de vidrio, con capacidad de 500 mL y 3.5 cm de diámetro. Una vez empacada la columna se le agregó el extracto mezclado con el gel sílice formando una capa uniforme. Se colectaron fracciones de 150 mL cada una, empleando como fase móvil un sistema de elución Hexano:Acetato de etilo (Hx:AcOEt) (8:2). El fraccionamiento fue monitoreado por CCF, reuniendo las fracciones que presentaban similitudes. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor.

### **7.2.2 Obtención del acetato de cacalol**

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 3.5 g del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*, se le añadieron 4 mL de piridina anhidra y 5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó por 48 h a temperatura ambiente.

Posteriormente a la mezcla de reacción, se le añadieron 30 mL agua y 30 mL de acetato de etilo. El contenido del matraz se trasvasó a un embudo de separación y se le añadieron 20 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10%. La fase acuosa se llevó a pH neutro con una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 10 %. Se recuperó la fase orgánica y se le agregó sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhídrido para eliminar los residuos de agua, se filtró y se concentró a presión reducida.

El producto de la reacción de acetilación se separó mediante CCA. Se tomaron 3 g del residuo acetilado, se disolvieron en 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se le añadieron 3 g de gel sílice y se eliminó el disolvente con agitación constante hasta que se obtuvo un polvo.

La columna se empacó utilizando 30 g de gel de sílice (previamente mezclada con hexano) con un tamaño de malla de 70-230 como fase estacionaria, en una columna de vidrio, con capacidad de 500 mL y 3.5 cm de diámetro. Una vez empacada la columna se le agregó el producto de la reacción mezclado con el gel sílice formando una capa uniforme. Se colectaron fracciones de 150 mL cada una, empleando como fase móvil un sistema de elución de Hx:AcOEt (8:2). El fraccionamiento fue monitoreado por CCF, reuniendo las fracciones que presentaban similitudes. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor.

### **7.3 Modelo de evaluación anti-inflamatoria in vitro.**

#### **7.3.1 Cultivos celulares**

##### **7.3.1.1 Línea celular de macrófagos de ratón, RAW 264.7**

La línea celular RAW 264.7 fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD.). Las células fueron cultivadas a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y una atmósfera saturada de agua con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células se crecieron en medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). 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). Para su expansión las células se separaron de las platas de cultivo con una solución salina estéril (PBS) suplementada con tripsina 0.025% y EDTA 2nM y se sembraron en botellas de plástico estériles de 75  $\text{mm}^2$  (Corning, Acton, MA, EUA)

se esperó hasta que llegaron a confluencia y posteriormente se resembraron en placas de 6 pozos y una vez que estas estaban en confluencia se iniciaron tratamientos (Ahn, Siddiqi, Aceituno, Simu, & Yang, 2016).

### **7.3.1.2 Cultivo primario de células endoteliales HUVEC**

Las HUVEC se obtuvieron siguiendo el método establecido por Jaffe y colaboradores, con algunas modificaciones (Watanabe & Jaffe, 1993). Brevemente, después del parto eutócico o cesáreo de la voluntaria (no más de 12 h después), los cordones fueron recolectados y transportados en solución salina fisiológica fría hasta la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ. Todos los pasos subsecuentes se realizaron en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. La parte externa del cordón se limpió con etanol al 70% y con una gasa estéril. Se canuló la vena umbilical y se cerró el extremo con una pinzas quirúrgicas. Se eliminaron los residuos de sangre con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) tibia (2 lavados aproximadamente) y se verificó que la vena no estuviera perforada. Se ocluyeron ambos extremos del cordón, con cinchos de plástico de electricista estériles. Se perfundió con una solución de colagenasa Tipo II al 0.02% en medio de cultivo, aproximadamente 1 mL /cm de cordón, hasta que la vena se vio turgente. Se sumergió el cordón en un frasco estéril con solución salina fisiológica tibia y se colocó en un baño maría a 37 °C, durante 10 min. Posteriormente, se masajeo el cordón, la solución de colagenasa, las células endoteliales desprendidas se colectaron en un tubo para centrifugar de 50 mL, con 2 mL de medio de cultivo M-199 SigmaAldrich, USA) (pH 7.0) suplementado con 10% suero bovino fetal, glutamina al 1%, 10 µg/mL de mitógeno endotelial, 1 UI / mL de heparina y 100 UI/mL de penicilina/estreptomicina. Se hizo pasar PBS por la vena 3 veces y se recolecto está

solución en el mismo tubo. Se centrifugo por 10 min a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 4 mL de medio de cultivo M-199 suplementado y se sembró en una placa de cultivo de 28 cm<sup>2</sup>. La placa se mantuvo en incubación a 37 °C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 80% de humedad durante 12 h. Una vez concluido el procedimiento se colocó el cordón umbilical en una bolsa de desechos biológicos para su incineración. El medio de cultivo se cambió cada tercer día durante un periodo de aproximado de una semana, o hasta llegar a confluencia de 80% (que corresponde a 800,000 células aproximadamente). Se descartaron cultivos en lo que al examen visual presentaron más del 1% de fibroblastos, esta distinción se hizo basada en las diferencias en su morfología. Los cultivos primarios de células HUVEC se emplearon dentro de las 4 primeras semanas después de obtener los cordones umbilicales.

### **7.3.2 Prueba de Cristal violeta.**

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de cristal violeta. Se sembraron 20,000 células/pozo en placas de 48 pozos con medio D-MEM para las RAW 264.7 o M199 para las HUVEC y se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante una noche. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS y posteriormente se le agregó medio de cultivo nuevo con diferentes concentraciones de acetato de cacalol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 y 150 µM) durante 48 h. Pasadas las 48 h se retiró completamente el medio de cultivo de las placas de cultivo; inmediatamente, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % (durante 15 min; posteriormente, se retiró el fijador y se dejó secar al aire; después, se procedió a teñir a las células con el colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200

mM (SigmaAldrich, USA) pH 6 por 20 min , al cabo de los cuales se retiró el exceso de colorante a través de lavados con agua destilada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante es solubilizado en ácido acético al 10 % (J.T. Baker, Mex.), por 20 min en agitación constante, para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en un lector de placas.

### **7.3.3 Determinación de concentraciones de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6)**

Para determinar la concentración de citocinas se usó la técnica de ELISA. Se basa en un inmunoensayo tipo sandwich con anticuerpos monoclonales específicos para las citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), inmovilizados en una microplaca de 96 pozos en una fase sólida que contiene controles estándares. Para esto las células RAW 264.7 fueron sembradas en placas de 6 pozos, se pretrataron con AC (50 y 100  $\mu$ M) transcurrido el tiempo se estimularon con 5  $\mu$ g / mL de LPS durante 180 min y se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se colectó el medio D-MEM de las células con cada uno de los tratamientos y se colocaron en los pozos apropiados con una enzima peroxidasa de rábano y un anticuerpo monoclonal marcado (conjugado). Las moléculas de la citocina se quedan intercalada entre la fase sólida y el conjugado. Después se incubaron por 2 h en un agitador mecánico a temperatura ambiente, los pozos de la microplaca se lavaron con solución salina amortiguada de lavado para eliminar el conjugado no unido. Posteriormente se adicionó a cada pozo el sustrato proporcionado por el proveedor, incubando nuevamente la microplaca en un agitador mecánico a temperatura ambiente por 15 min. Durante este tiempo el sustrato reacciona con el conjugado unido en los pozos. Después del tiempo de incubación se detuvo la reacción, añadiendo una solución de bloqueo de reacción, cambiando

el color de azul a amarillo. Finalmente, se cuantificó la densidad óptica por lector de microplacas a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de citocinas en la muestra. La absorbancia de cada muestra se interpoló con cada uno de las absorbancias de las muestras. Esto se hizo para cuantificar cada una de las diferentes citocinas.

### **7.3.4 Análisis de la transcripción génica en células RAW 264.7 y HUVEC**

#### **7.3.4.1 Extracción de ARN total**

Para la extracción de ARN total en las células RAW264.7 o HUVEC se empleó la técnica descrita por Chomczynski (1993). Para cuantificar la expresión de los genes de TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6 se sembraron  $1 \times 10^6$  células en una botella para su proliferación. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 60 mm, las células RAW 264.7 se pretrataron con CA a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  y las HUVEC con 35 y 70  $\mu\text{M}$  durante 60 min y posteriormente se estimularon con 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS durante 90 min (se hicieron 4 repeticiones con una  $n=5$  cada repetición) Posteriormente se colectó el medio de cultivo y fueron lavadas con PBS. Se agregó 1 mL de Trizol<sup>®</sup> y se desprendieron de la placa con un gendarme de goma estéril. El homogenizado se depositó en tubos Eppendorf en donde se les dejó reposar en hielo. Posteriormente se agregaron 0.3 mL de cloroformo y agitó el tubo durante 20 segundos. Las muestras se centrifugaron a 11700 xg durante 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa (fase incolora) y se le agregó 0.5 mL de isopropanol y se dejó reposar por 25 min en hielo. Después se centrifugó a 11700 xg durante 10 min a 4 °C se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con un 1 mL de etanol al 75 % y se centrifugó a 11700 xg 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 una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.15 % o agua libre de RNasas. Se observó la integridad del ARN total, mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Finalmente se cuantificó por espectrofotometría mediante NanoDrop® a una absorbancia de 260 nm.

#### **7.3.4.2 Cuantificación relativa de la expresión del ARNm**

El DNAc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total por PCR utilizando la transcriptasa reversa ImProm II, también se utilizaron iniciadores alzar (ramdon primers 0.5 µg/µL). El volumen total de reacción (20 µg) se incubó con la siguiente secuencia de ciclos: inicio 25 °C por 5 min, seguido de por 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 enzima ADN polimerasa del kit de “ADN master plus SYBR Green 1” para los genes de TNF-α, IL1β, IL-6, COX-2, V CAM, ICAM y 36B4 como gen de referencia (Tabla1). El proceso se llevó utilizando SYBR Green con el equipo Rotor Gene, La mezcla de reacción con un volumen fina de 10µL que contenía 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes de TNF-α, IL1β, IL-6, COX-2, V.CAM, ICAM y 36B4 como gen de referencia y la mezcla 1X que contenía la enzima Fast Start amortiguador para PCR,, SYBR Green y MgCl<sub>2</sub> 3.5 Mm.

**Tabla 2.** Secuencias de los primers utilizados en qPCR

PRIMER	SECUENCIA
TNF- $\alpha$	F5'-CCTCCCTGTCA TCAGTTCTA-3' R5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
IL-1 $\beta$	F5'-TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT-3' R5'-GTCACAGAGGACGGGCTCTT-3'
IL-6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' R5'-CAGAAT TGCCATTGCACAAC-3'
COX-2	F5'-CAACACCTGAGCGGTTACC-3' R5'-CAGAGGCAATGCGGTTCTGAT-3'
V-CAM	F5'-TGTTTGCAGCTTCTCAAGCTTTTA -3' R5'-GTCACCTTCCCATTTCAGTGGA-3'
I-CAM	F5'-CAACACCTGAGCGGTTACC-3' R5'-CAGAGGCAATGCGGTTCTGAT-3'
36B4	F5'-AAGCGC GTCCTGGCATTGTCT-3' R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTG GT-3'

### 7.3.5 Extracción de proteína

Se sembraron células RAW264.7 o HUVEC en placas y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Luego, las células RAW 264.7 se preincubaron con CA 50 y 100  $\mu$ M y las HUVEC con 35 y 70  $\mu$ M o BAY 11-7085 10  $\mu$ M ((E) -3- (4-t-butilfenilsulfonil) -2-propenonitrilo) (10  $\mu$ M) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 1 h antes de la estimulación con LPS (Escherichia coli 0111: B4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) (1  $\mu$ g / mL). La estimulación con LPS fue realizada durante 25 min o 180 min. Posteriormente las células se recolectaron y se lavaron dos veces con PBS frío. Enseguida, las células se rasparon en PBS, se recogieron y se centrifugaron a 330 x g durante 5 min para recuperar el sedimento celular. Se congeló en hielo seco durante 1 min y se resuspendió suavemente en 100  $\mu$ L de solución hipotónica (Hepes 10 mM pH 7,9,



KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DTT 1 mM) y se centrifugó a 3300 x g a 4 ° C; el sobrenadante se recogió para obtener proteínas citoplasmáticas. El sedimento que contenía núcleos celulares se resuspendió en 50 µL de solución hipertónica (Hepes 10 mM pH 7,9, NaCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, glicerol al 25 %, EDTA 0,2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM), se incubó durante 30 min se mezcló suavemente a 4° C y se centrifugó a 1340 xg durante 10 min. Los sobrenadantes que contenían las proteínas nucleares se recogieron y diluyeron 1: 1 con un tampón HDKE (Hepes 20 mM pH 7,9, KCl 50 mM, glicerol al 25 %, EDTA 0,2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM) y se almacenaron a 70° C. Las concentraciones de proteínas nucleares y citoplasmáticas se determinaron mediante el método de Bradford (56).

### **7.3.6 Ensayo de cambio de movilidad electroforético (EMSA)**

Los extractos nucleares obtenidos se utilizaron como se describió anteriormente. Un oligonucleótido bicatenario con 21 pares de bases que contiene 12 nucleótidos de la secuencia de consenso para el sitio de unión de los elementos de respuesta de consenso de NF-κB (5-AGTTGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-3, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EE.UU.) se marcó con  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (NEN, 6000 Ci / mmol). La reacción se llevó a cabo en presencia de quinasa T4 (Boehringer Mannheim), con incubación a 37 ° C durante 30 min, y se detuvo calentando a 65 ° C durante 15 min, seguido de la adición de 30 µL de Tris-Borato solución amortiguada -EDTA (1X TBE, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). La muestra permaneció congelada hasta su uso. Las muestras se procesaron en geles de acrilamida al 7,5 % en condiciones no desnaturizantes. La unión de la sonda previamente marcada al factor NF-κB presente en los extractos nucleares se realizó con 10 µg de extractos nucleares, 1 µg de poli dI / dC, 1 µg de pd (N) 6 y 10 µg de suero bovino albúmina. La incubación

se realizó en tampón HDKE (HEPES 20 mM, pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM y ditioneitol 5 mM). La sonda marcada se añadió al final para iniciar la reacción de unión. Después de 10 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción añadiendo una solución de Ficoll al 15 % complementada con tintes de electroforesis de azul de fenol. Las mezclas de reacción se separaron en un gel con 1X TBE a 100 V durante 120 min. El gel se secó y se expuso a una pantalla de almacenamiento de fósforo (Molecular Dynamics, San Francisco, CA, EE. UU.), la cual fue fotodocumentada en un Storm 850 Phosphorimager (Molecular Dynamics, San Francisco, CA, EE. UU.). La imagen se desarrolló en un Typhoon 9400 (Molecular Dynamics / GE) y se analizó con el software ImageQuant (Molecular Dynamics, San Francisco, CA, EE. UU.).

### **7.3.7 Inmunoensayos tipo Western Blot**

El extracto citoplásmico se separó en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BIO-RAD) con un tampón de transferencia de glicina (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8.8) y 10 % de metanol (v / v) durante la noche). Al día siguiente se bloquearon los sitios inespecíficos con leche en polvo baja en grasa (Svelty, 5% p / v); Las membranas se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario específico IKK- $\alpha$  /  $\beta$  (1:2000 GeneTex, Irvine, CA, EE. UU.) y fosfo-IKK $\alpha$  /  $\beta$  (Ser 176/177) (1:2000 GeneTex, Irvine, CA, EE. UU. ), p65 (1:6000 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EE. UU.), fosfo-p65 (Ser 536) (1:2000 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EE. UU.), I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:1,500 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EE. UU.), Fosfo-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser 32/36) (1:2,000 Cell Signaling Technology, Inc., MA, EE. UU. Además); V-CAM (1:500 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EE. UU.); I-CAM (1:1000 Santa Cruz

Biotechnology, Inc., CA, EE. UU.) y  $\beta$ -actina (1:10,000 Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA.) Diluido en TBS-Tween 1% -Albúmina 1% a 4 ° C. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios (anti-HRP de conejo (1: 20.000 Pierce-Thermo, Waltham, MA, EE. UU.) Y anti-HRP de ratón (1:10.000 Pierce Thermo, Waltham, MA, EE. UU.) A temperatura ambiente y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia “Super-Signal” System (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). Las señales generadas se detectaron mediante el equipo Fusion FX Vilber Lourmat (VILBER Smart Imaging), las manchas se cuantificado por densitometría.

#### **7.3.8 Actividad de COX-2**

Las células RAW264.7 se sembraron en placas y se incubaron a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Las células se incubaron previamente con CA (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 durante 1 h antes de la estimulación con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 3 h. Posteriormente, las células se recolectaron y lavaron dos veces con PBS frío y se procesaron de acuerdo con el protocolo de fábrica del kit de actividad COX (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.).

#### **7.3.9 Ensayo de Adhesión de células U-937 sobre HUVEC**

En placas de 12 pozos se sembraron 100,000 HUVEC por pozo y se esperó 48 h para que formaran una monocapa. Posteriormente se pretrataron con AC (35 y 70  $\mu$ M) transcurrido el tiempo se estimularán con 5  $\mu$ g/mL de LPS durante 180 min y a los pozos de control negativo solo se les cambio el medio, a los de control positivo se les coloco medio con LPS. Paralelamente las U-937 se lavaron dos veces con

RPMI con 10 % SBF y se resuspendieron en un medio 50 % RPMI y 50 % de M-199 para poder sembrar 200,000 células U-937 por pozo de HUVEC.

Después de los 180 min de incubación con los LPS, se retiró ese medio y se adicionó el medio con las U-937 por pozo; se co-incubaron por 180 min. Al terminar la incubación, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se lavaron 3 veces con 50 % de RPMI sin rojo fenol y 50 % PBS, retirando las células U-937 flotantes y quedando sólo las adheridas a las HUVEC. Posteriormente, se agregaron 500 µl de NaOH 0.2 M a cada pozo, para lisar las células; se dejó actuar por 12 h. Pasadas las 12 h los lisados celulares de cada pozo se recolectaron y se colocaron en frascos con 3 mL de líquido de centelleo (un frasco por pozo) y se cuantificó la cantidad de radioactividad en un contador de centelleo. Como control del 100% de células que se pudieron haber adherido al endotelio y de la radioactividad total, se utilizaron 200,000 células U-937 marcadas con timidina tritiada las cuales tuvieron el mismo tratamiento con NaOH 0.2 M.

Todo el material que estuvo en contacto con la radioactividad se desechó en un contenedor de desechos radioactivos. Todos los procesos que involucraron el manejo y desecho de material radiactivo se realizaron según las normas de la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias y se llevaron a cabo por un POE certificado por el INCMNSZ.

#### **7.3.10 Ensayo de Griess para cuantificación de NO en HUVEC**

En placas de 12 pozos se sembraron 100,000 HUVEC por pozo y se esperó 48 h para que formaran una monocapa. Posteriormente se pretrataron con AC (35 y 70 µM) y después se estimularon con 1 µg / mL de LPS, transcurrido el tiempo se midió

el nitrito total a una absorbancia de 540 nm después de añadir los reactivos de Griess (Csonka et al., 2015)

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados serán expresados como  $\pm$  el error estándar de la media (S.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 de Tukey-Kramer con una  $p \leq 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Análisis fitoquímico

#### 9.1.1 Obtención del cacalol

Después de cinco extracciones, se obtuvieron 15 g del residuo del extracto hexánico de 500 g de raíces secas de *P. decompositum*, lo que corresponde al 3% del rendimiento en peso seco.

Del residuo del extracto hexánico de *P. decompositum*, 3 g fueron separados por CCA usando como sistema de elución HX:AcOEt de forma creciente. Sólo se obtuvieron 40 fracciones, de las cuales, de la fracción 3 a la 17 presentaron el compuesto, pero no cristalizó ya que tenía impurezas. Posteriormente se realizó una placa preparativa para poder obtener el compuesto puro de donde se obtuvieron 620 mg de un sólido amarillo con punto de fusión de 91-92°C y un Rf de 0.51 en un sistema de elución Hx:AcOEt (8:2). De este compuesto se tomó una pequeña muestra y se envió a caracterizar mediante Resonancia Magnética (RMN) como cacalol.

En el espectro de infrarrojo se observa una banda característica del grupo OH en 3495 cm<sup>-1</sup>, que corresponde al fenol.

En el espectro de masas, el valor del ión molecular (M<sup>+</sup>) es de 230 m/z, que corresponde a la masa molar del compuesto.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se presentó a 5.12 ppm la señal correspondiente al hidrogeno del grupo OH y a 7.22 ppm se distingue la señal perteneciente al hidrogeno del C<sub>12</sub>.

### **9.1.2 Obtención del acetato de cacalol.**

Se prosiguió hacer la reacción de acetilación de cacalol y obtener así acetato de cacalol con la finalidad de proteger al grupo fenólico ya que este es muy fácil de oxidar. La reacción se llevó a cabo directamente sobre cacalol, se obtuvieron 690 mg de acetato de cacalol, que corresponden al 4.6 % de rendimiento del peso del residuo acetilado. El acetato de cacalol se presentó como un sólido beige, con un punto de fusión de 105-106 °C y un RF de 0.63 en HxOEt (8:2).

Mediante el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se corroboró la identidad del acetato de cacalol. En el espectro infrarrojo se observó una banda en  $1764\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo carbonilo del acetato, además que desapareció la banda de  $3495\text{ cm}^{-1}$ , perteneciente al grupo hidroxilo del fenol. Además de observar la señal del carbonilo, la presencia de la vibración C-O en  $1107\text{ cm}^{-1}$  representa una confirmación de que existe un grupo éster en la molécula (ver anexo 1.1-1.6).

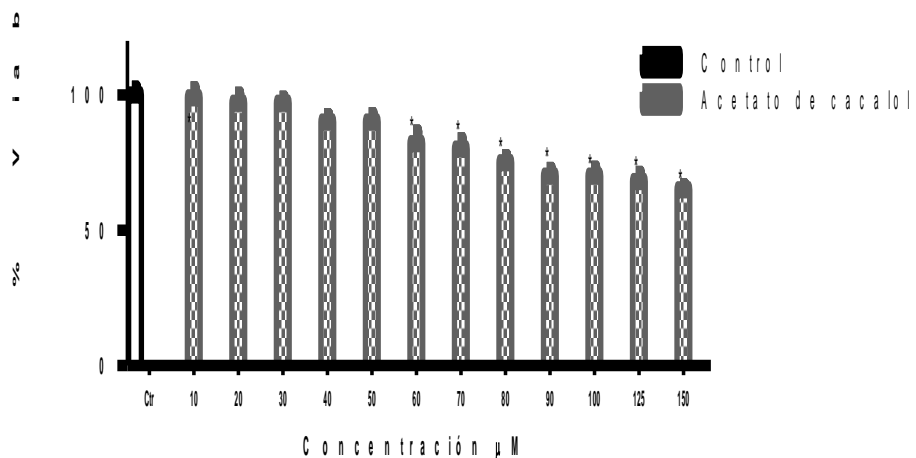
## **9.2 Evaluación in vitro**

### **9.2.1 Prueba de Cristal Violeta**

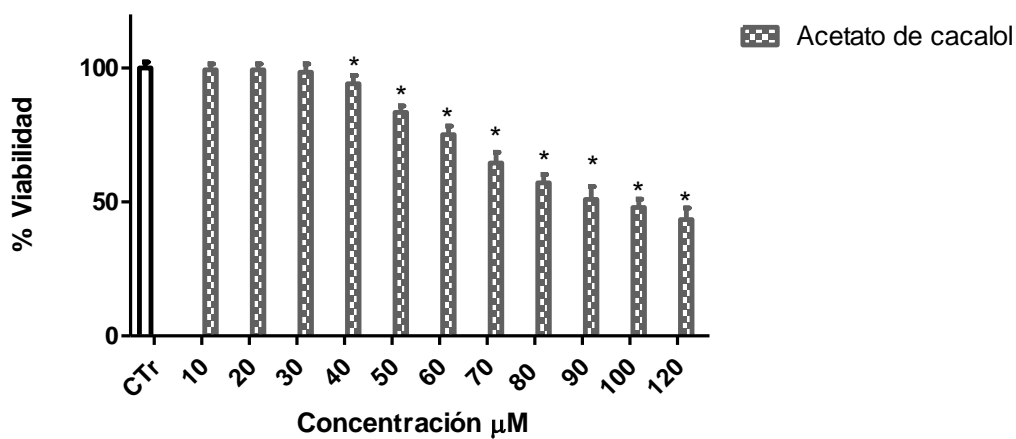
Las concentraciones elegidas para evaluar el acetato de cacalol fueron 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 10, 120, 130, 140, y 150  $\mu\text{M}$ , en el caso de las células RAW 265.7 se seleccionó la concentración de 50  $\mu\text{M}$  y 100 y para las HUVEC la de 35 y 70  $\mu\text{M}$ , el criterio de selección consistió en utilizar concentraciones que al ser utilizadas mantengan un porcentaje de funcionalidad mayor al 95% (Figura 5 y 6).

Las figuras 5 y 6 nos indican que en las células RAW como en las células endoteliales no presentan alteración en la viabilidad a contracciones máximas de 100 y 40  $\mu\text{M}$

respectivamente, por lo que en todos los experimentos posteriores se utilizaras concentraciones menores en un lapso no mayor a 48 h.



**Figura 5.** Viabilidad en células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de acetato de cacalol (n=6); \*Diferencia significativa respecto al control (p< 0.05).

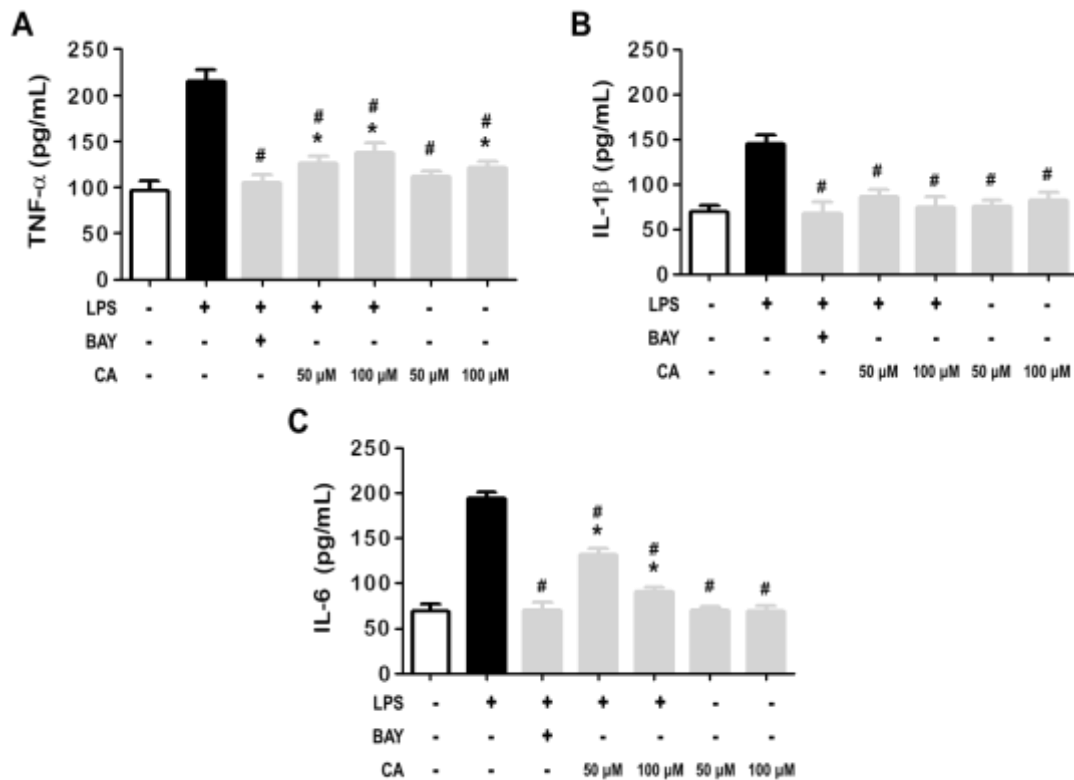


**Figura 6.** Viabilidad HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de acetato de cacalol (n=6); \*Diferencia significativa respecto al control (p< 0.05).



### 9.2.2 Secreción de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ e IL-6

Los resultados previos de nuestro grupo en donde el CA disminuye el proceso inflamatorio sugerían que una posible interferencia con la secreción de moléculas proinflamatorias. Por esta razón se decidió evaluar si el CA interfería en la secreción de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6, en un modelo in vitro de macrófagos murinos inmortalizados RAW 264.7 estimulados con LPS. El CA se evaluó sobre la cantidad de citocinas inflamatorias acumuladas en el medio después de 3 h con el estímulo de LPS mediante un ensayo de ELISA en el medio de cultivo. La figura 6 muestra que en presencia del CA la cantidad de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6 disminuyen, la presencia de CA interfiere con la acumulación de tal manera que la cantidad de IL- $\beta$  apenas está por encima de los valor del control, a concentraciones de 50 y 100  $\mu$ M la cantidad de IL- $\beta$  presente en el medio era indistinguible de las células control (Figura 7B, columnas 4 y 5). Como un control de inhibición utilizamos el compuesto BAY 11-7085 que inhibe la señalización de LPS a nivel de las complejo de las IKKs, con este inhibidor tampoco hubo acumulación detectable de IL-1 $\beta$  en el medio en comparación al control (Figura 7B, columna 3). Ni CA ni BAY por si solos afectaron los niveles de IL- $\beta$  en comparación con el control. En el caso de TNF- $\alpha$  e IL-6 el CA disminuyo la acumulación de citocinas, pero, no alcanzaron los niveles basales (Figura 7A columna 4 y 5; Figura 7C columna 4 y 5). En el caso de TNF- $\alpha$  e IL-6, la presencia solo de BAY no afecta la acumulación de ninguna de las dos citocinas con respecto al control (Figura 7A columna 3; Figura 7C columna 3). La contracción de 100 por si sola aumento de significativamente la acumulación de TNF- $\alpha$  con respecto al control (Figura 7A columna 7)

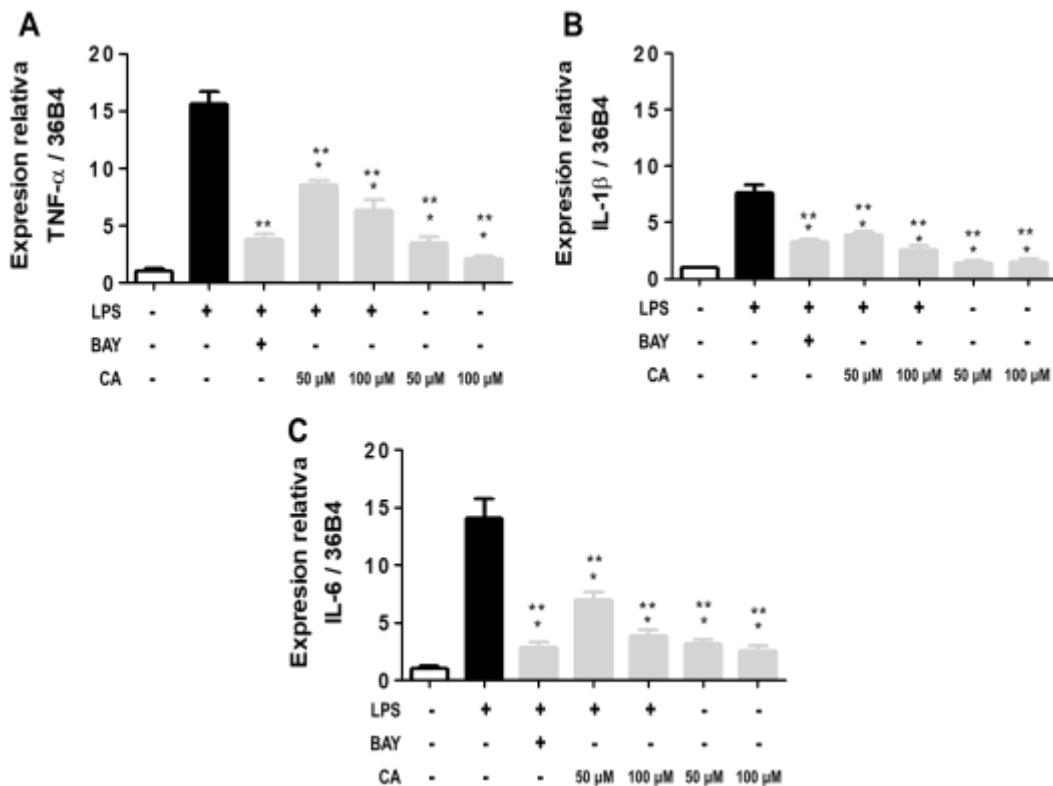


**Figura 7.** El efecto de CA sobre la secreción de citocinas inflamatorias en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M). Se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 3 h; al final de este tiempo, se recogió el medio de cultivo y se cuantificaron mediante ELISA TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el control; #  $p < 0,05$  en comparación con LPS.

De estos resultados se concluye que un tratamiento profiláctico de 1 h previo a la adición de LPS es suficiente para disminuir en forma significativa la acumulación de las 3 citocinas evaluadas: TNF (50-60% de inhibición); IL1 (100% de inhibición); IL-6 (50-75%).

### 9.2.3 Expresión relativa de TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ e IL-6

Con los resultados obtenidos previamente se decidió evaluar si la interferencia de CA en la acumulación de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6 se correlaciona con una interferencia a nivel de expresión de su ARNm. Por esta razón se decidió evaluar si el CA interfiere en la expresión de su ARNm empleando el mismo modelo y diseño experimental de la Figura 7. El CA si interfirió en la expresión relativa de los ARNm de las tres citocinas evaluadas, este efecto es un patrón muy semejante a lo observado en la acumulación de citocinas de la figura 8: inhibición 50 y 70% en la de TNF, inhibición de un 70 % para IL-1 e inhibición entre un 50 -80% para IL-6 (Figura 8).



**Figura 8.** El efecto del acetato de cacalol sobre la expresión de citocinas inflamatorias en células RAW264.7 estimuladas con LPS. Se pretrataron macrófagos

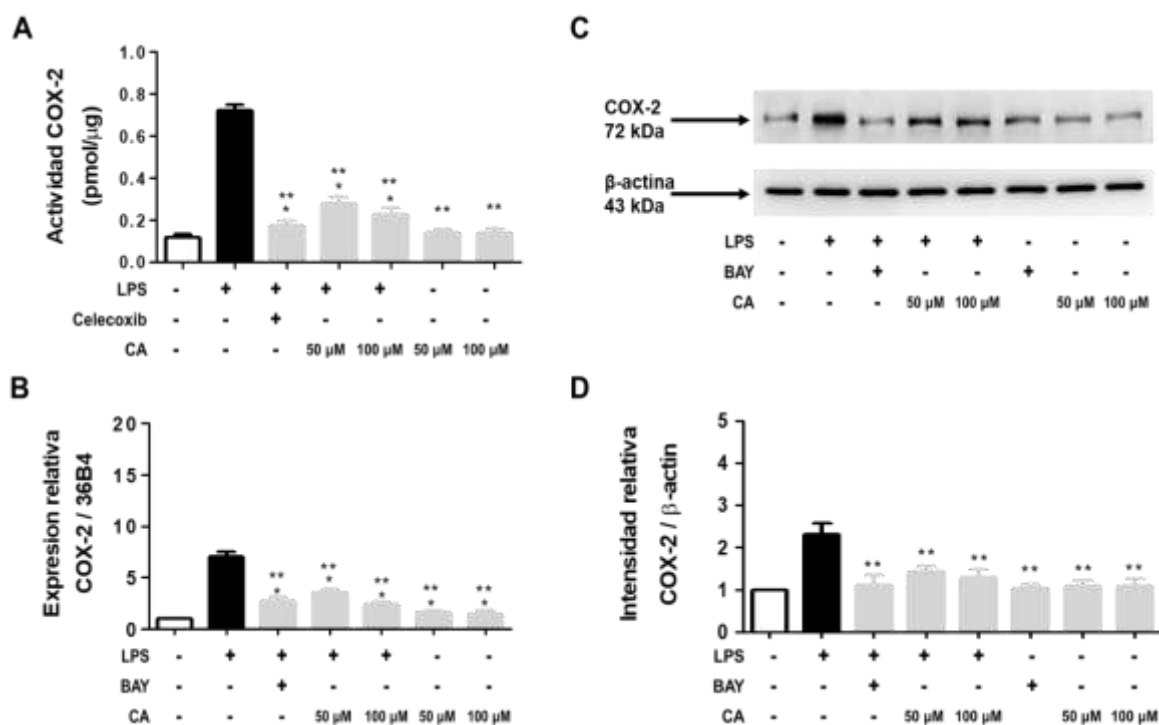
RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M). Se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 90 min; después de aislar el ARN total, la expresión relativa de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C) se cuantificó mediante RT-qPCR. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el control; #  $p < 0,05$  en comparación con LPS.

Estos resultados nos indican que ni CA ni BAY, a pesar de haberse dado de una forma profiláctica son capaces de regresar los niveles de los mensajeros a sus niveles basales.

#### **9.2.4 Actividad, expresión y producción de COX-2**

Además de incrementos en la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 se ha reportado que los macrófagos incrementan otras moléculas asociadas a las a la producción de PG y TX, por esta razón se decidió evaluar si el CA también interfiere en la actividad, expresión relativa y producción de COX-2. Seguimos el mismo modelo y diseño experimental que se presentó en las figuras 7 y 8. Se observó que el CA afectaba tanto a la expresión relativa, la cantidad de proteína y la actividad de COX-2. Con 100  $\mu$ M de CA el contenido de mensajero de COX-2 disminuyó 75%, mientras que a nivel de proteína la disminución fue del 50%, y en la actividad enzimática disminuyó más del 50% (Figura 9). Dado que el efecto inhibitorio se da a nivel de mensajero es probable que las caídas en proteínas sean in reflejo de la inhibición al efecto transcripcional.

Los resultados de las figura 7, 8 y 9 sugieren que el CA interfiere a nivel transcripcional con la señalización activada por LPS.

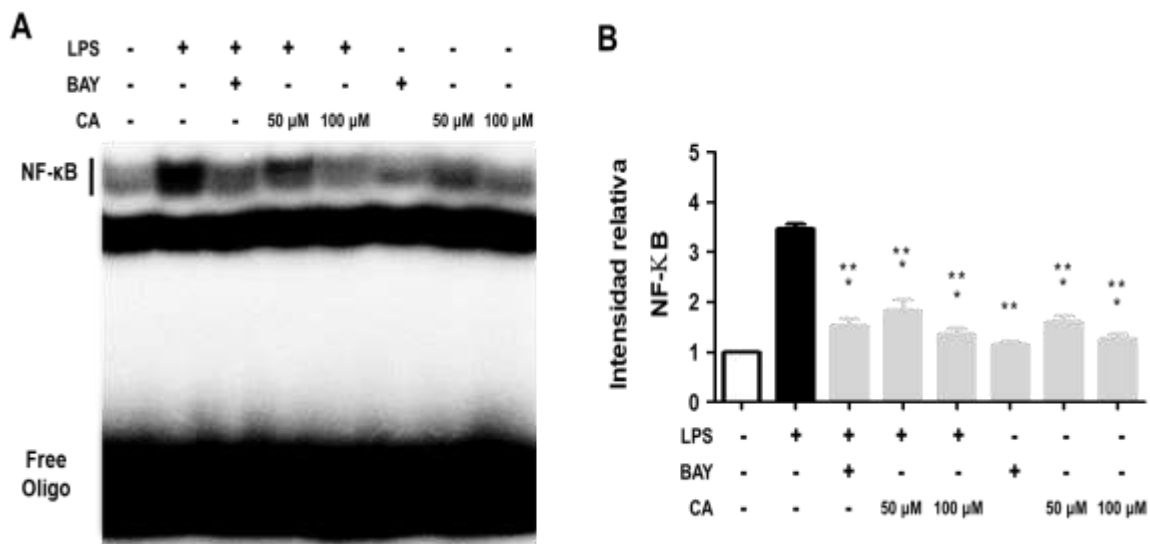


**Figura 9.** El efecto del acetato de cacalol sobre la actividad, expresión y producción de COX-2 en células RAW264.7 estimuladas con LPS. Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100 μM), Celecoxib (10 μM) o BAY 11-7085 (10 μM); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1 μg / mL) durante 90 min para medir la expresión y durante 3 h para medir la actividad y el contenido de proteína. La actividad de la enzima COX-2 se determinó mediante ensayo fluorimétrico (A). La expresión relativa de COX-2 se cuantificó mediante RT-qPCR (B). El contenido de proteínas se evaluó mediante inmunoensayos tipo Western blot (C), y las intensidades de las bandas se midieron mediante densitometría y se normalizaron con β-actina (D). Los valores se presentan como medias ± SEM de seis experimentos independientes. \* p <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

### **9.2.5 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

Existen diferentes maneras de evaluar la actividad transcripcional de un gen, donde evaluar los niveles de ARNm son los más comunes. Todos los resultados anteriores apuntan a que el CA está interfiriendo con la vía de señalización de LPS, dado que todos los genes evaluados (TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6 y COX-2) presentan elementos de respuesta para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B decimos evaluar la asociación de este factor de transcripción a la cromatina después de un estímulo con LPS en ausencia o presencia del CA. Se utilizó el mismo modelo y diseño experimental que en los experimentos anteriores. Se observó que el CA disminuyó la intensidad de los complejos entre una sonda marcada con P<sup>32</sup> y los factores NF- $\kappa$ B presentes en extractos nucleares de células pretratadas con CA por 1 h y sometidas a un estímulo con LPS por 25 min. La disminución de intensidad producida por 100  $\mu$ M de CA fue muy parecida a la disminución inducida por BAY 11-7085 (Figura 10A carriles 3 y 5). Al igual que en el caso de los mensajeros los niveles de intensidad de NF- $\kappa$ B con ninguno de los inhibidores llegó a niveles basales (Figura 10B).

Estos resultados indican que la interferencia de CA parecería estar afectado la cantidad NF- $\kappa$ B activado a nivel citoplásmico, o bien la eficiencia con la que este se transloca al núcleo o una combinación de ambos.



**Figura 10** Los efectos del acetato de cacalol sobre la translocación de NF- $\kappa$ B en el núcleo inducida por LPS en células RAW 264.7. Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min y luego se realizó la extracción de proteína nuclear. La translocación de NF- $\kappa$ B se evaluó mediante un ensayo EMSA en un gel de acrilamida al 7,5% con sondas marcadas para NF- $\kappa$ B (A). La translocación de NF- $\kappa$ B se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* P <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

## 9.2.6 Efecto del CA en la vía de activación de NF- $\kappa$ B estimulada por LPS.

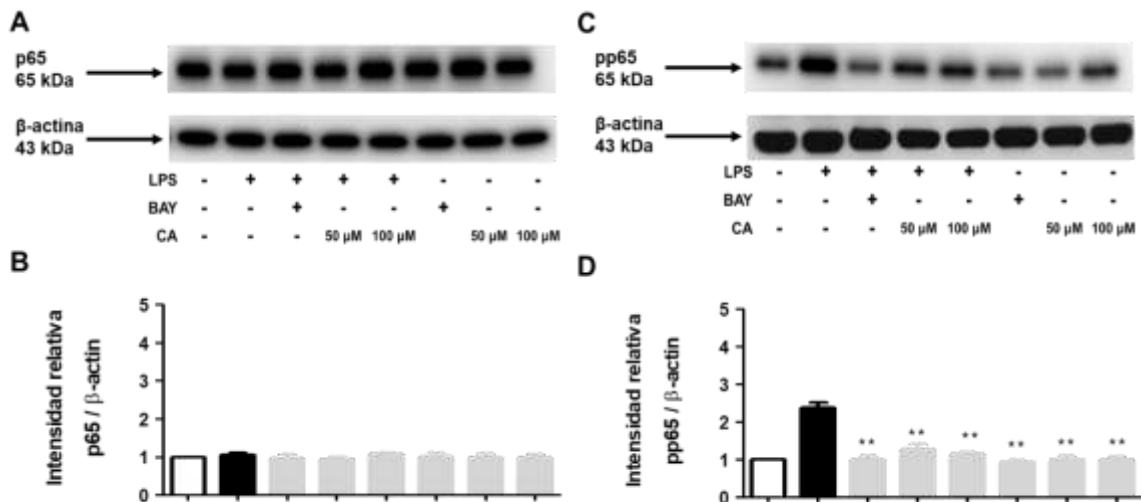
### 9.2.6.1 Inmunoensayos tipo Western de células RAW 264.7

Los resultados previos indican que CA podría estar interfiriendo con la vía de señalización que inicia con la activación de TLR4 por LPS y culmina con la liberación de formas citoplásmicas libres de inhibidores de NF- $\kappa$ B. Por tanto, se decidió evaluar el efecto del CA sobre la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B cuantificando los niveles de

p65, IKB- $\alpha$  y el complejo IKK (total y fosforilado) mediante inmunoensayos tipo Western.

### 9.2.6.1.1 Efecto de CA sobre p65

La estimulación con LPS aumentó el estado de fosforilación de p65 1,5 veces, en comparación con el control (Figuras 11C y 11D carril 2). Los macrófagos pretratados con CA 100  $\mu$ M y posteriormente estimulados con LPS aumentaron la fosforilación de la subunidad p65 solo 0,2 veces con efecto semejante al producido por BAY 11-7085. Los niveles de p65 total fueron similares en todos los grupos (Figura 11A).



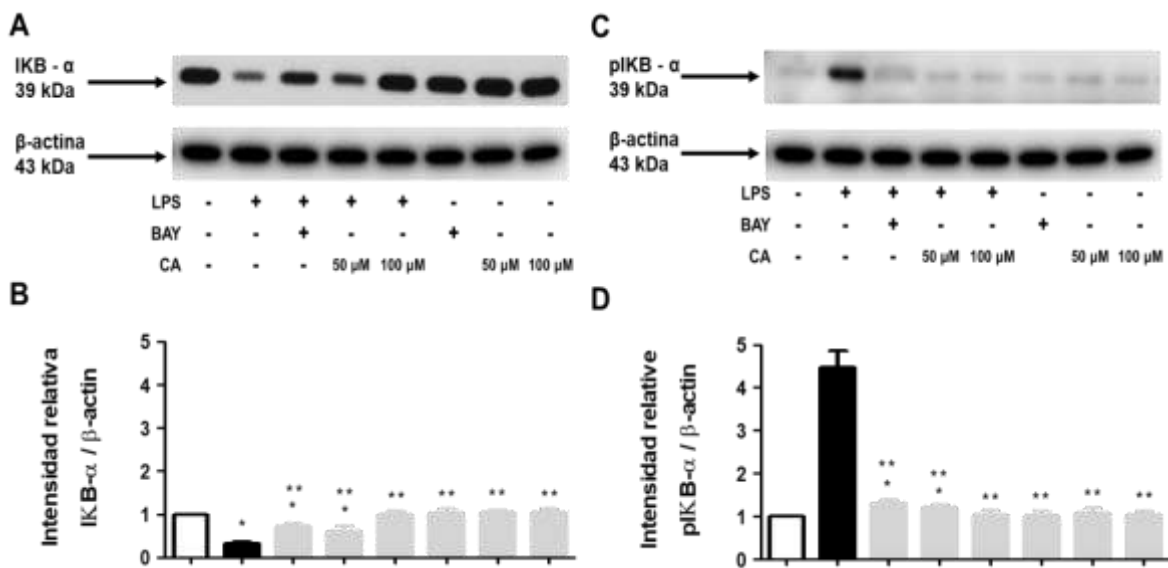
**Figura 11.** El efecto del acetato de cacalol sobre p65. Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de p65 no fosforilada (p65 total) y fosforilada (fosfo-p65) en la proteína Ser536 se determinaron mediante transferencia de inmunoensayos tipo Western (A, C). La intensidad relativa de p65 no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D) normalizando con la intensidad de  $\beta$ -actina. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de tres



experimentos independientes. \*p <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

### 9.2.6.1.2 Efecto de CA sobre IKB- $\alpha$

También se evaluaron las formas no fosforiladas de IKB- $\alpha$  y la forma fosforilada p- IKB- $\alpha$  siguiendo el mismo diseño previamente y descrito. Los resultados muestran que el LPS aumentó la forma fosforilada hasta 3.2 veces, lo que resultó en una degradación de 0,7 veces para IKB- $\alpha$ . BAY 11-7085 y acetato de cacalol (50 o 100  $\mu$ M) interfirieron en forma significativa con la formación de la forma fosforilada que disminuyó 3,2 veces (Figura 12C columna 4 y 5)

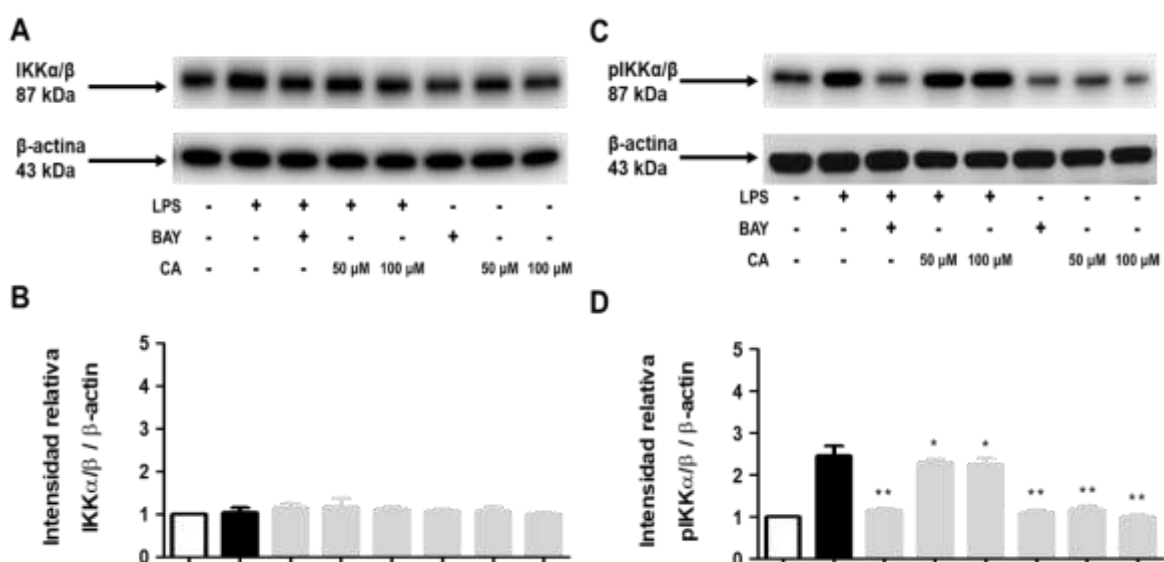


**Figura 12.** El efecto del acetato de cacalol sobre IKB- $\alpha$ . Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de IKB- $\alpha$  no fosforilada y fosforilada en la proteína Ser32 / 36 se determinaron mediante inmunoensayos tipo Western blot (A, C). La intensidad relativa de IKB- $\alpha$  no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan como medias

± SEM de seis experimentos independientes. \* P <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

### 9.2.6.1.3 Efecto de CA sobre el complejo IKK $\alpha$ / $\beta$

Finalmente, se determinó el efecto de CA sobre el estado de fosforilación de IKK $\alpha$  /  $\beta$ . LPS aumentó la fosforilación de IKK hasta 1,5 veces en comparación con el control (Figura 13C y 13D, columna 2). El tratamiento con CA 50 y 100  $\mu$ M no cambió la fosforilación del complejo IKK $\alpha$  /  $\beta$ . Los niveles totales de IKK $\alpha$  /  $\beta$  no presentaron diferencia significativa con respecto al control (Figura 13A y 13B).



**Figura 13.** El efecto del acetato de cacalol sobre IKK- $\alpha$  /  $\beta$ . Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (50 y 100  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de IKK- $\alpha$  /  $\beta$  no fosforilada y fosforilada en la proteína Ser176 / 177 se determinaron mediante inmunoensayos tipo Western blot (A, C). La intensidad relativa de IKK- $\alpha$  /  $\beta$  no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan

como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* P <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

En conjunto los resultados de las figuras 11, 12 y 13 nos indican que los pretratamientos con CA interfirieron en la vía de señalización de LPS después de la activación de las IKKs, ya que en presencia del CA no se observa la fosforilación de la proteína IKB- $\alpha$ . Esta interpretación es consistente con la disminución en la translocación de NF-KB al núcleo observada en la figura 10.

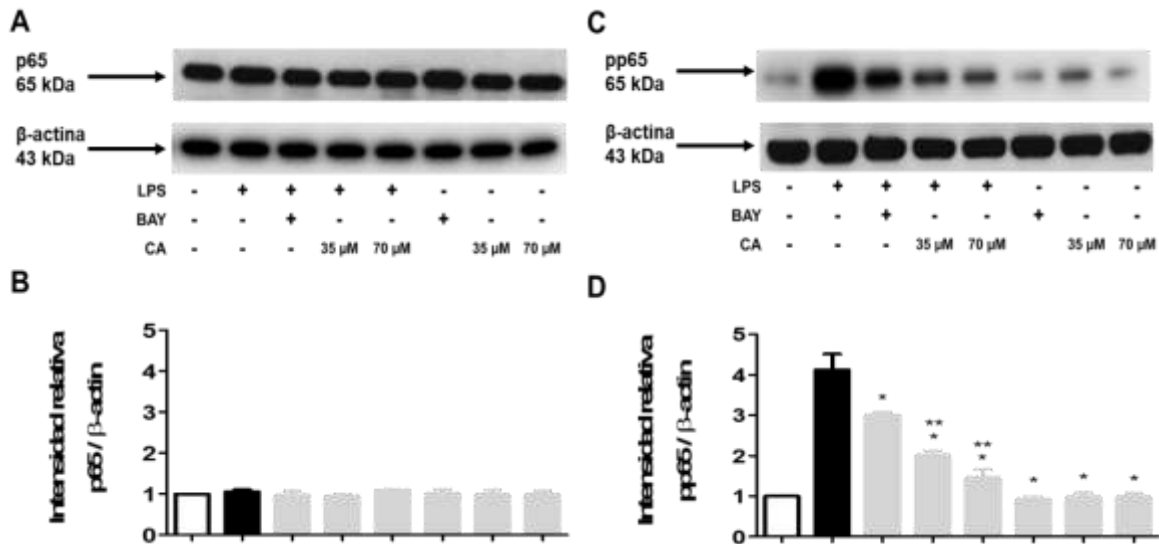
#### **9.2.6.2 Inmunoensayos tipo Western Blot en células HUVEC**

Los resultados previos indican que los pretratamientos de CA están interfiriendo en la fosforilación de IKB- $\alpha$  en los macrófagos RAW 264.7. Esto nos hizo suponer que este mismo efecto podría estar ocurriendo en otro tipo celular importante en el proceso inflamatorio como lo son las células endoteliales que también presentan TLR4 y una vía de señalización análoga a la de los macrófagos, así que se decidió evaluar el efecto del CA sobre la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B en células endoteliales humanas derivadas de cordón umbilical (HUVECs), utilizando el mismo diseño experimental que el de las figuras 11, 12 y 13

##### **9.2.6.2.1 Efecto de CA sobre p65**

La estimulación con LPS aumentó el estado de fosforilación de p65 3.5 veces, en comparación con el control (Figura 14D carril 2). Las células HUVEC pretratados con CA 70  $\mu$ M y posteriormente estimulados con LPS aumentaron la fosforilación de la subunidad p65 solo 1 vez, un efecto mayor que el de BAY 11-7085 el cual aumento

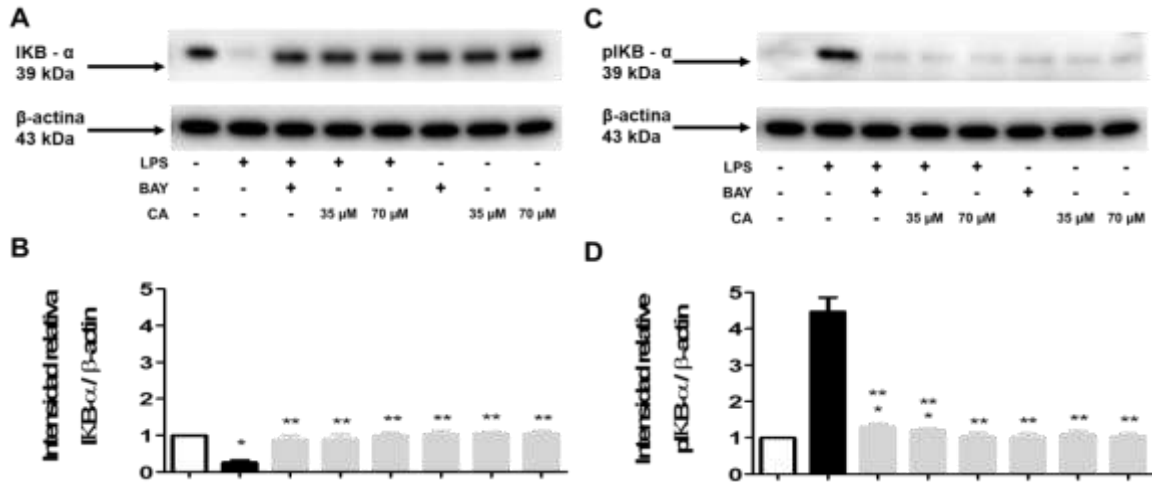
la fosforilación 2 veces. Los niveles de p65 total fueron similares en todos los grupos (Figura 14A).



**Figura 14.** El efecto del acetato de cacalol sobre p65. Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (35 y 70  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de p65 no fosforilada y fosforilada en la proteína Ser536 se determinaron mediante transferencia de inmunoensayos tipo Western (A, C). La intensidad relativa de p65 no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* P <0,05 en comparación con el control; #p <0.05 en comparación con LPS.

#### 9.2.6.2.2 Efecto de CA sobre IKB- $\alpha$

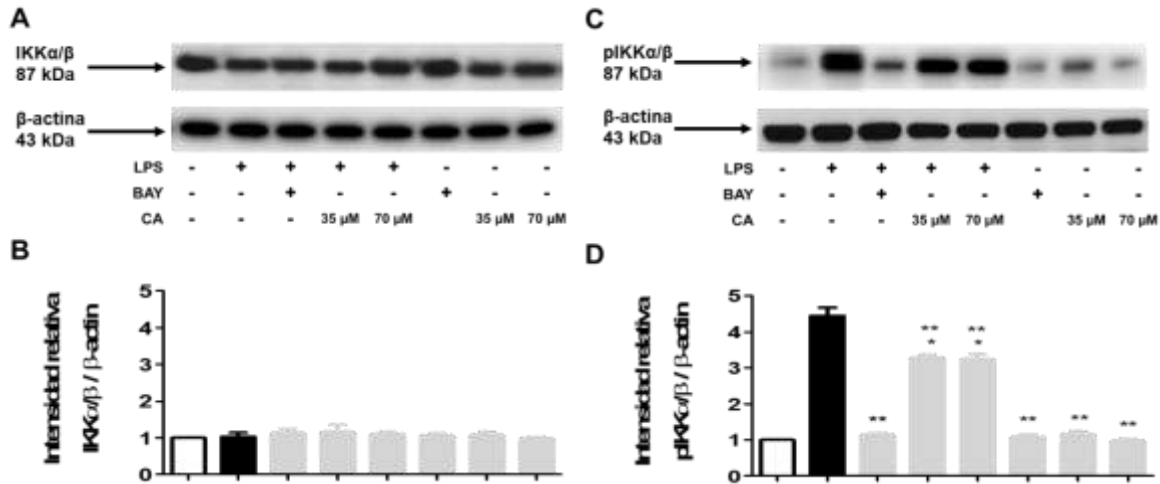
También se evaluó IKB- $\alpha$  y se observó que el LPS aumentó la fosforilación de IKB- $\alpha$  4 veces (Figura 15C, columna 2), lo que resultó en una degradación del 80% para IKB- $\alpha$  (Figura 15A). BAY 11-7085 y CA (35 y 70  $\mu$ M) disminuyeron la fosforilación de IKB- $\alpha$  3,5 veces, regresándolo a niveles basales (Figura 15C columna 4 y 5)



**Figura 15.** El efecto del acetato de cacalol sobre IKB- $\alpha$ . Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (35 y 70  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de IKB- $\alpha$  no fosforilada y fosforilada en la proteína Ser32 / 36 se determinaron mediante inmunoensayos tipo Western blot (A, C). La intensidad relativa de IKB- $\alpha$  no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el control; # $p < 0.05$  en comparación con LPS.

### 9.2.6.2.3 Efecto de CA sobre el complejo IKK $\alpha$ / $\beta$

Finalmente, se determinó el efecto de CA sobre el estado de fosforilación del complejo IKK $\alpha$  /  $\beta$ . El tratamiento con LPS aumentó la fosforilación de IKK 3 veces (Figura 16C) en comparación con el control (Figura 16C columna 2). El tratamiento con CA 35 y 70  $\mu$ M no cambió la fosforilación del complejo IKK $\alpha$  /  $\beta$ . Los niveles totales de IKK $\alpha$  /  $\beta$  no presentaron diferencia significativa con respecto al control (Figura 16A).



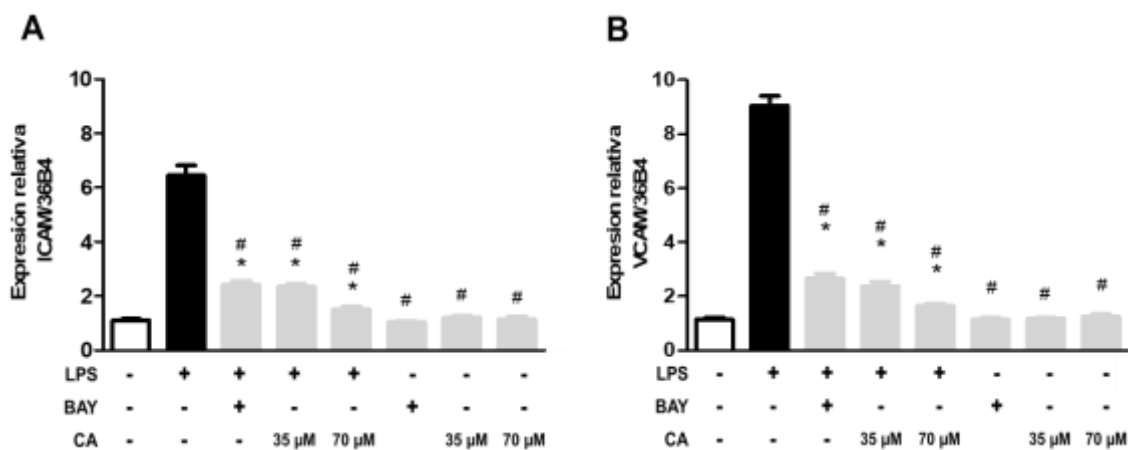
**Figura 16.** El efecto del acetato de cacalol sobre IKK- $\alpha$  /  $\beta$ . Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con acetato de cacalol (CA) (35 y 70  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 25 min. Los niveles de IKK- $\alpha$  /  $\beta$  no fosforilada y fosforilada en la proteína Ser176 / 177 se determinaron mediante inmunoensayos tipo Western Blot (A, C). La intensidad relativa de IKK- $\alpha$  /  $\beta$  no fosforilada y fosforilada se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* $p$ <0,05 en comparación con el control; # $p$ <0.05 en comparación con LPS.

En conjunto los resultados de las figuras 14, 15 y 16 nos sugieren un mecanismo de inhibición semejante al que observamos en las células RAW 264.7, mostrando que los pretratamientos con CA interfiere en la vía de señalización de LPS después de la activación de las IKKs, ya que en presencia del CA no se da la fosforilación de la proteína IKK- $\alpha$ .

## 9.2.7 Respuestas funcionales en células HUVEC tratadas con CA / LPS

### 9.2.7.1 Efecto del CA sobre la expresión de y producción de moléculas de adhesión en células HUVEC

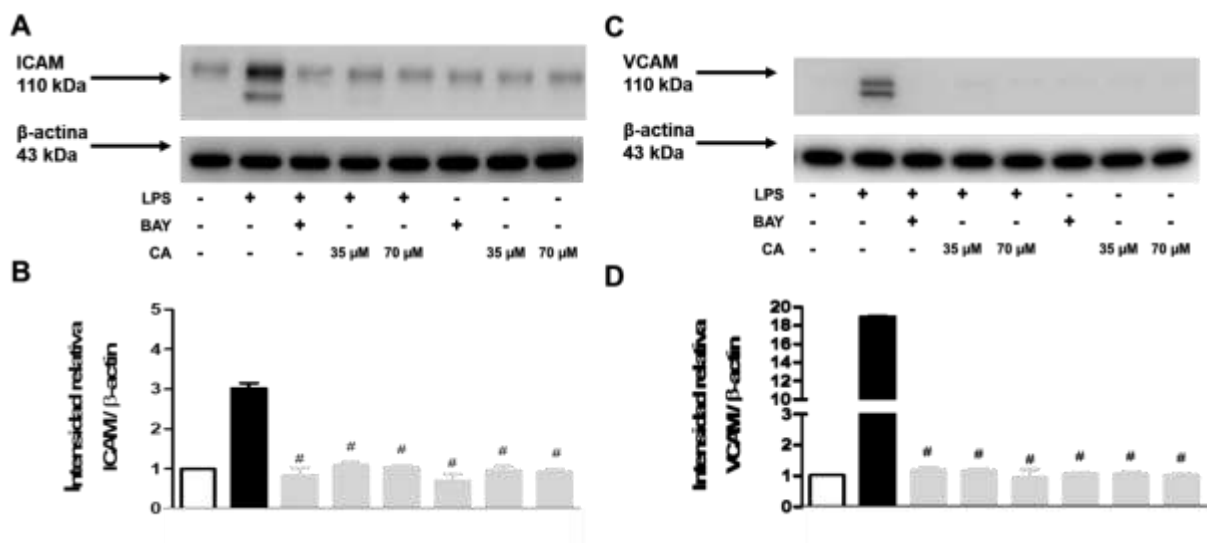
Al observar que el efecto de CA tanto en macrófagos como en células HUVEC se asocia a una interferencia de la vía de señalización inducida por LPS, se decidió evaluar la expresión relativa y producción de ICAM y VCAM, dos moléculas de adhesión importante en el proceso de extravasación leucocitaria durante la inflamación



**Figura 17.** El efecto del CA sobre la expresión de moléculas de adhesión en células HUVEC estimuladas con LPS. Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con CA (35 y 70  $\mu$ M) o BAY 11-7085 (10  $\mu$ M). Se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu$ g / mL) durante 90 min; después de aislar el ARN total, la expresión relativa de ICAM y VCAM se cuantificó mediante RT-qPCR. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el control; #  $p < 0,05$  en comparación con LPS.

La estimulación con LPS aumentó más de 6 veces la expresión de estas proteínas, mientras que los tratamientos con CA a una concentración de 35  $\mu$ M y BAY 11-7085, atenuaron notablemente este aumento en más de un 70% en comparación con el

control (Figura 17, columnas 4 y 5). En cuanto la producción de ICAM y VCAM por medio de inmunoensayos tipo Western Blot se observó el mismo comportamiento en donde el grupo estimulado con LPS aumento la producción de ICAM y VCAM más de 7 veces pero el pretratamiento con 35  $\mu\text{M}$  de CA disminuye a niveles similares a los basales (Figura 18).

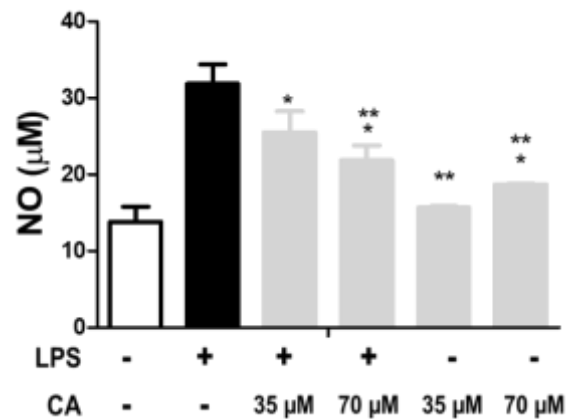


**Figura 18.** El efecto del CA sobre ICAM y VCAM. Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con CA (CA) (35 y 70  $\mu\text{M}$ ) o BAY 11-7085 (10  $\mu\text{M}$ ); se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu\text{g}$  / mL) durante 180 min. Los niveles de ICAM y VCAM se determinaron mediante inmunoensayos tipo Western Blot (A, C). La intensidad relativa de ICAM y VCAM se calculó mediante análisis de densitometría de las bandas en el gel (B, D). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el control; # $p < 0.05$  en comparación con LPS.



### 9.2.7.2 Efecto del CA sobre producción de NO en células HUVEC.

Las células endoteliales contribuyen a la inflamación con la formación y liberación de NO, esencial para la vasodilatación local. Esto nos llevó a evaluar el efecto del CA sobre la producción de NO por medio del ensayo de Griess. En la figura 19 se puede observar que la presencia de 35 CA  $\mu\text{M}$  no altera con concentración de NO con respecto a las células control.



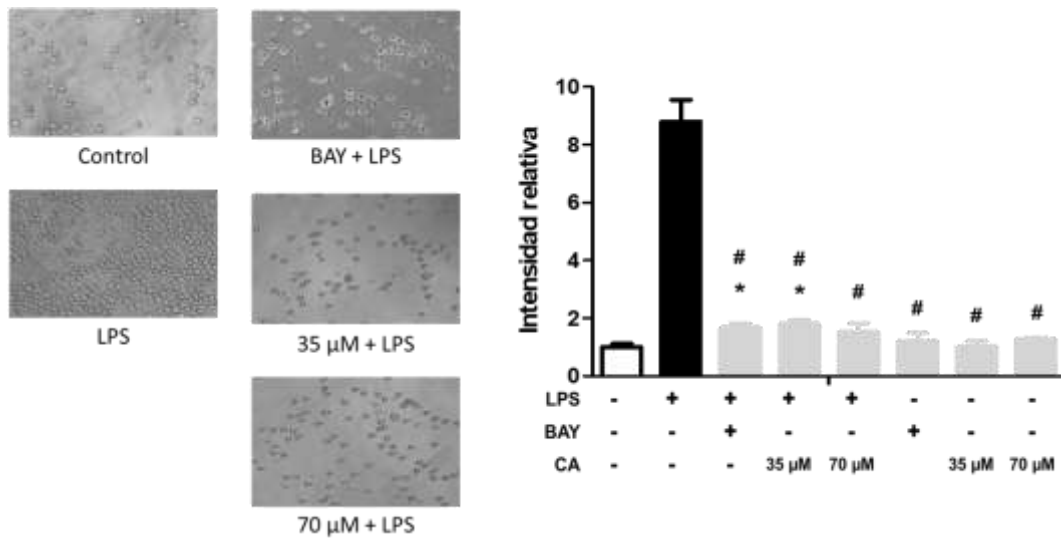
**Figura 19.** El efecto de CA sobre la secreción de NO en células HUVEC estimuladas con LPS. Se pretrataron macrófagos RAW 264.7 durante 1 h con CA (CA) (35 y 70 $\mu\text{M}$ ). Se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu\text{g}$  / mL) durante 3 h; al final de este tiempo, se recogió el medio de cultivo y se cuantificó el NO. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el control; #  $p < 0,05$  en comparación con LPS.

### **9.2.7.3 Efecto del CA en un ensayo de adhesión de células U-937 sobre células HUVEC**

Un fenómeno importante en el proceso inflamatorio es la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales para su posterior extravasación, con esto en mente se decidió generar un ensayo que valora la capacidad adhesiva de las células endoteliales activadas por LPS. Se midió la cantidad de radioactividad asociada a las células U-937 premarcadas con timidina tritiada co-incubadas con células HUVEC estimuladas con LPS y pretratadas con CA o BAY-117085. Las células HUVEC se pretrataron con LPS por 3 h. Después se cambió a un medio sin LPS y se co-incubaron con U-937 premarcadas con timidina tritiada como se describe en materiales y métodos.

El LPS indujo una adhesión celular 7 veces mayor en comparación con el grupo control. En el caso de la co-incubación de células HUVEC con células U-937 en los grupos pretratados con CA (35 Y 70  $\mu$ M) y posterior estimulación LPS la adhesión disminuyó 6 veces en comparación con el grupo tratado con LPS. En el caso de los grupos que solo fueron tratados con CA no se observó diferencia con respecto al grupo control.

En conjunto estas pruebas funcionales (Figura 17-20) de las células HUVEC activadas por LPS indica que la interferencia del CA entre IKKs e IKB en las células HUVEC previene su activación funcional medida con tres parámetros independientes: Producción de moléculas de adhesión (ICAM y VCAM), producción de NO y capacidad proadhesiva.



**Figura 20.** El efecto del CA sobre la adhesión celular entre células HUVEC y las células U-937 estimuladas con LPS. Se pretrataron células HUVEC durante 1 h con CA (AC) (35 y 70  $\mu\text{M}$ ) o BAY 11-7085 (10  $\mu\text{M}$ ). Se retiró el medio y se añadió medio fresco con LPS (1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) durante 180 min; y las células HUVEC y las células U937 se co-encubaron por 180 min. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el control; #  $p < 0,05$  en comparación con LPS.

## 10. DISCUSIÓN

La inflamación es una respuesta del organismo ante un estímulo extraño. Ésta tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica cambios vasculares, eventos celulares, y la producción de mediadores químicos de la inflamación. Todos estos componentes del sistema forman parte de un proceso estrechamente vinculado que .extraño. En algunas patologías se mantienen de forma constante dicho proceso lo cual ocasiona que se desregule y con ello se exacerbe la intensidad de la enfermedad, favoreciendo el aumento de la mortalidad de la enfermedad. Para este tipo de padecimientos ya existen fármacos en el mercado, los cuales tratan de aminorar el proceso inflamatorio, sin embargo, en algunos padecimientos la causa es desconocida o presenta un importante componente genético, por lo que el uso de dichos fármacos antiinflamatorios debe ser bajo un esquema crónico. Los AINEs se encuentran entre los más utilizados, continuamente surgen nuevas preparaciones, lo que habla de que aún no se ha encontrado el agente antiinflamatorio ideal. Un problema adicional es que prácticamente todos poseen un riesgo potencial para desarrollar efectos adversos importantes en los pacientes. En este sentido, un tratamiento ideal sería aquel que disminuyera los signos de la inflamación y controle sus secuelas perjudiciales (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2018; Oliviero, Scanu, Zamudio-Cuevas, Punzi, & Spinella, 2018; Tursi & Elisei, 2019). No es extraño, por lo tanto, que la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios, tanto por síntesis química como a partir de productos naturales continúe intensamente.

En la literatura se pueden localizar ciertas plantas con efecto antiinflamatorio, evaluadas en diferentes modelos biológicos, las cuales principalmente contienen flavonoides, glucósidos y terpenos, algunos también con capacidad

antioxidante.(Arulselvan et al., 2016; Choodej et al., 2018; N. Garg et al., 2017). Sin embargo, de la mayoría de estos compuestos aún no se conoce su mecanismos de acción farmacológico, aunque se hipotética que podría estar asociado a la inhibición de las enzimas importantes en la regulación de mediadores inflamatorios, tales como la fosfolipasa A2, COX's y LOX's, cuya inhibición reduce las concentraciones de PG y LT. Ambos componentes se encuentran involucrados en respuestas inmunológicas y en algunos casos, se ha reportado su capacidad inhibitoria sobre al factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Bak et al., 2013; Blackburn, Gill, Krol, & Taylor, 2017; Chung et al., 2017)

Un ejemplo de este tipo de plantas con actividad antiinflamatoria es *Psacalium decompositum*, se ha reportado que algunos de los compuestos que se han aislado de esta especie vegetal han presentado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El cacalol es uno de sus compuestos mayoritarios, también se ha reportado que tiene actividad antiinflamatoria importante. Así mismo se ha reportado que el compuesto es muy fácil de oxidar, pero, al acetilarlo en su grupo OH su estructura se vuelve es más estable (Jimenez-Estrada et al., 2006; Merino-Aguilar et al., 2014). Sin embargo, poco se ha avanzado en el conocimiento de las actividades de este compuesto y del mecanismo de acción antiinflamatoria que podría presentar. Por esta razón, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria del CA y determinar como afecta la vía de señalización de NF-KB. Para ello primero se realizó la obtención del extracto hexanico de *Psacalium decompositum* para poder obtener cacalol, el cual fue acetilado posteriormente para transformarlo en CA.

Para evaluar el potencial antiinflamatorio del CA, se utilizó un modelo celular que consistió en macrófagos estimulados con LPS en cultivo. Se realizó la prueba de cristal violeta para determinar la viabilidad del CA. En general los macrófagos presentaron una viabilidad celular superior al 90 % después de los tratamientos. Otro modelo de estudio, consistió en células endoteliales de cordón umbilical denominadas HUVEC. En ellas, se observó que concentraciones mayores de 80  $\mu\text{M}$  disminuían la viabilidad más del 90 %. Es por eso que se seleccionaron dos concentraciones para cada uno de los tipos celulares; en el caso de las células RAW 264.7 se escogieron las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  del CA y en el caso de las HUVEC se utilizaron las concentraciones de 35 y 70  $\mu\text{M}$  de CA (Figura 4 y 5). Con estos resultados podemos inferir que las HUVEC son más sensibles al CA.

Posteriormente en las células RAW 264.7 tratadas con CA, se evaluó el efecto sobre de citocinas, tanto en liberación de proteína como en expresión relativa, estas fueron TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Estas citocinas son consideradas iniciadoras importantes de la respuesta inflamatoria y mediadores del desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias, ya que estimula la liberación de NO y PGE a la lesión tisular y contribuye al fallo múltiple de órganos (Ahn et al., 2016; Cheng et al., 2017; Gopalsamy, Farouk, Tengku Mohamad, Sulaiman, & Perimal, 2017).

Se puede observar una correlación positiva entre los resultados de abundancia relativa y de expresión. La estimulación con LPS aumentó al doble la expresión y secreción de estas citocinas, mientras que los tratamientos con CA (100  $\mu\text{M}$ ) y BAY 11-7085 (inhibidor irreversible IKK- $\alpha$ ) administrados antes de la estimulación, atenuaron notablemente en más de un 50% los niveles de expresión y secreción. (Figuras 7 y 8). Estos resultados son considerados con potencial benéfico ya que

TNF- $\alpha$  juega un papel clave en la inducción y perpetuación de la inflamación mediante la activación de los macrófagos y regulación al alza de otras citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión endoteliales (Barrette AM1, 2016). En el caso de IL-1 $\beta$  e IL-6 que son citocinas típicas producidas por la estimulación con LPS y que tienen un papel importante en la fase aguda de la inflamación, su disminución representa un pronóstico positivo para la resolución del proceso inflamatorio (Castillo-Arellano et al., 2018; Dai et al., 2018; Gopalsamy et al., 2017).

Con los resultados anteriores podemos decir que el CA genera una respuesta antiinflamatoria a nivel de citocinas proinflamatorias ya que disminuyeron los niveles de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Esto sugiere que el CA puede regular a la baja la respuesta de fase aguda en macrófagos estimulados con LPS, controlando el proceso inflamatorio, y con ello disminuyendo la liberación excesiva e inadecuada estas citocinas previniendo la generación de diversas enfermedades. Por lo tanto, la inhibición de su expresión y liberación es un mecanismo vital para el tratamiento de la inflamación.

Otra molécula importante en las enfermedades inflamatorias es la COX, en particular la COX-2, es importante mencionar que esta proteína también es regulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Comúnmente la COX-2 es un blanco terapéutico clásico para el diseño de fármacos antiinflamatorios, especialmente AINE. Estos se unen a enlaces de hidrógeno en la posición polar 120 de la arginina, bloqueando el sitio catalítico de la COX, lo que resulta en una disminución de la actividad enzimática y la síntesis de prostanoïdes (Ahn et al., 2016; Gautam et al., 2011; Kawata, Murakami, Suzuki, & Fujisawa, 2018; Zwicker et al., 2017). Se evaluó la actividad de

COX-2, y se observó CA disminuyó significativamente la actividad de COX-2. Mostrando una actividad similar a la generada por el fármaco de referencia Celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, mientras que la estimulación con LPS aumentó su actividad 5 veces (Figura 9A). El efecto del CA sobre la actividad de COX-2 podría deberse a la interacción con su sitio catalítico o a la inhibición de su expresión.

Alternativamente, el CA podría reducir los niveles de expresión y la proteína COX-2. Por ello se evaluó tanto la expresión de ARNm como las proteínas, y se observó que CA afectaba tanto la expresión génica como proteica de COX-2. Se detectó una disminución de 3 veces en los niveles de expresión de ARNm en los grupos tratados con CA en comparación con el grupo LPS (Figura 9B). Además, CA redujo los niveles de proteína en 2 veces (Figura 9-C y 9-D). La disminución de la actividad de la COX-2 podría generarse por el descenso en su expresión, lo que conduce a una menor abundancia relativa de proteínas, resultando en una menor actividad enzimática. El acoplamiento molecular entre CA y COX-2 debe explorarse en estudios posteriores, y con ello valorar la posibilidad de contar con un doble mecanismo (Blackburn et al., 2017; Choodej et al., 2018; Ferrer et al., 2019).

La disminución en la expresión de TNF- $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , IL-6 y COX-2 sugiere que el CA podría estar generando su efecto antiinflamatorio al inhibir la actividad de su factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Esto se evaluó más a fondo mediante un EMSA, una técnica que permite evaluar la activación de factores de transcripción, basada en interacciones ADN-proteína. Los macrófagos estimulados con LPS aumentaron la unión de NF- $\kappa$ B al ADN 2,5 veces. El CA a 50 y 100  $\mu$ M disminuyó la activación de



NF- $\kappa$ B en 1,7 y 2,1 veces, respectivamente. BAY 11-7085, un inhibidor corriente arriba de esta vía de señalización, disminuyó de forma similar al grupo de CA 100  $\mu$ M.

Se ha reportado que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y COX-2 están reguladas principalmente a nivel transcripcional, por p50 y p65; estas son dos subunidades que conforman a NF- $\kappa$ B, las cuales son importantes para la activación de éste factor cuando los macrófagos son estimulados por LPS (Cheng et al., 2017; Choodej et al., 2018) Cuando no hay estímulo que active a NF- $\kappa$ B, este se encuentra inhibido por I $\kappa$ B- $\alpha$  y no puede translocarse al núcleo. La vía de señalización de NF- $\kappa$ B puede ser activada por diferentes estímulos (LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1, etc). Existen dos puntos clave en la señalización de esta vía, una es la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , y la otra es la fosforilación de la subunidad p65. Una vez fosforilada esta subunidad, se transloca al núcleo y con ellos se lleva a cabo la transcripción de genes diana que están implicados el proceso inflamatorio (Blackburn et al., 2017; Chae, 2018; Chen et al., 2018).

Para determinar si el efecto observado está directamente en el dímero NF- $\kappa$ B o en la ruta de señalización aguas arriba, se midieron los niveles de p65 fosforilados y totales mediante transferencia de inmunoensayos tipo Western en macrófagos y en HUVEC. La subunidad p65 es la más abundante en el complejo NF- $\kappa$ B, que se fosforila durante los primeros 25 min después de que las células se estimulan con LPS. Los macrófagos tratados con BAY 11-7085 y 100  $\mu$ M de CA, aumentaron la fosforilación de la subunidad p65 hasta 0,1 y 0,2 veces, mientras que las HUVEC tratadas con 70  $\mu$ M lo aumentaron 2 y 1 veces respectivamente. El grupo estimulado

con LPS aumentó su fosforilación hasta 1,5 y 3.5 veces, en comparación con el control. Los niveles de p65 total fueron similares en todos los grupos en macrófagos y en HUVEC (Figura 11 y 14) lo que indica que los tratamientos no afectaron los niveles de p65 total, pero sí afectaron su fosforilación. Posteriormente, se evaluó el efecto de CA sobre otras proteínas río arriba de esta vía de señalización (IKB- $\alpha$  y el complejo IKK).

IKB- $\alpha$  retiene el dímero NF-kB (p50 / p65) en el citoplasma enmascarando su secuencia de localización nuclear y previniendo su translocación hacia el núcleo. Cuando IKB- $\alpha$  se fosforila, se vuelve poliubiquitinado y se degrada. En consecuencia, NF-kB se libera y se transloca al núcleo, uniéndose a la secuencia consenso (Feehan & Gilroy, 2019; Lawrence & Fong, 2010; Medler & Wajant, 2019). Esta relación entre fosforilación y degradación se observó en la presente investigación. En macrófagos el LPS aumentó la fosforilación de IKB- $\alpha$  hasta 3 veces lo que resultó en una degradación de 0,6 veces para IKB- $\alpha$ . BAY 11-7085 y CA (50 o 100  $\mu$ M) disminuyeron la fosforilación de IKB- $\alpha$  (3,2 veces) e inhibieron la degradación de IKB- $\alpha$ . En el caso de las HUVEC LPS aumentó la fosforilación de IKB- $\alpha$  4 veces y se observó una degradación de 0,8 veces para IKB- $\alpha$ . BAY 11-7085 y CA (35 o 70  $\mu$ M) disminuyeron la fosforilación de IKB- $\alpha$  de 3.5 veces (Figura 12 y 15).

Finalmente, se determinó el efecto de CA sobre la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$ . El tratamiento con CA 50 y 100  $\mu$ M en el caso de los macrófagos o 35 y 70  $\mu$ M para las HUVEC no cambió la tasa de fosforilación. LPS aumentó la fosforilación de IKK hasta 1,5 veces en macrófagos y 3 veces en HUVEC en comparación con el control y BAY

11-7085. Los niveles totales de IKK $\alpha$ / $\beta$  no cambiaron en ninguno de los grupos de los dos tipos celulares (Figura 13 y 16). Estos resultados nos indican que tanto en macrófagos como en HUVEC se observó que el CA no modificó el complejo IKK $\alpha$ / $\beta$ , ubicado río arriba de la señalización pero sí las fosforilaciones de IKB- $\alpha$  y p65. Es importante señalar que en HUVEC se observó un efecto más notorio, esto se puede deber a que este tipo celular (endotelio) proviene de un cultivo primario y es más sensible a cualquier cambio en su entorno. Es por eso que se decidió medir expresión y la producción de las proteínas de adhesión endotelial ICAM y VCAM, ya que desempeñan funciones vitales en los procesos inflamatorios son considerados una pieza clave para la infiltración celular durante el proceso inflamatorio, además de ser proteínas que también son reguladas por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Harjunpaa, Llorca Asens, Guenther, & Fagerholm, 2019; K. Siddiqui, George, Nawaz, & Joy, 2019; Yang et al., 2016). Se observó que los grupos tratados con CA y estimulación posterior con LPS disminuyeron la expresión y la producción de estas en comparación con el grupo que solo fue tratado con LPS (Figura 17 y 18), el descenso casi alcanza los niveles basales.

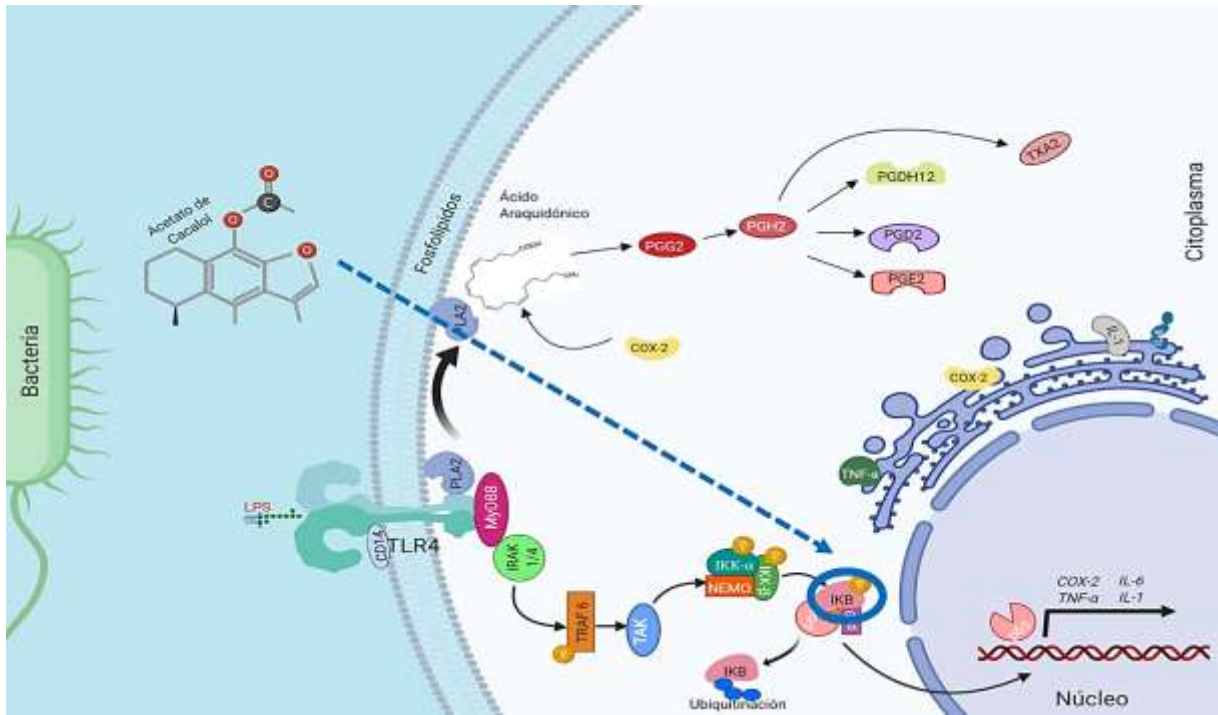
Estos resultados nos llevaron a cuantificar la producción de NO, el cual es un radical libre que puede ser liberado por los macrófagos y que es citotóxico para ciertos microorganismos. El NO puede actuar sobre las células endoteliales e inducir vasodilatación, un factor clave que beneficia a la infiltración leucocitaria y por ende al foco inflamatorio (Mitchell & Kirkby, 2018; Nakatake et al., 2017). En los resultados se observó que los grupos tratados con CA disminuyeron los niveles de NO,

particularmente la concentración de 35  $\mu\text{M}$  fue la que lo disminuye casi a niveles basales.

Esto nos llevó a utilizar un modelo de adhesión celular entre HUVEC y células U-937. Dicho modelo se basa en la estimulación de HUVEC con LPS para que inducir la expresión de moléculas adhesión. Posteriormente se co incuban con monocitos U-937 en suspensión (marcados con tritio) los cuales se deben de unir a las células endoteliales, en caso de no se unan se puede suponer que las células endoteliales (HUVEC) no expresaron moléculas de adhesión. Observamos que los grupos que fueron tratados con CA y estimulados con LPS solo aumentaron 1.5 veces sus adhesión celular en comparación el basal (células no estimuladas), y que el grupo que fue estimulado con LPS aumento más de 7 veces la adhesión celular. Con estos resultados podemos decir que la disminución en la adhesión celular se debe a que CA no está permitiendo que se produzcan moléculas de adhesión, ya que el factor de transcripción NF- $\kappa\text{B}$  no está induciendo su expresión, principalmente por inhibición de la translocación al núcleo, ya que se encuentra inhibido en el citoplasma por I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$ . Al no translocarse no induce la producción de sus genes respuesta como es el NO, ICAM y VCAM. y esto es lo que genera que no exista una adhesión celular entre los monocitos y las HUVEC.

Los resultados anteriores nos indican que la activación de NF- $\kappa\text{B}$  y la fosforilación de p65 podrían ser consecuencia de acciones directas de CA sobre la proteína I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  y este podría ser su posible mecanismo de acción (Figura 21). Estos resultados son similares a los reportados para otros terpenos antiinflamatorios, como genipina, triptólido y catalpósido, inhibidores de I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$

Estos resultados podría estar asociados con el efecto antiinflamatorio del CA que ya se ha reportado anteriormente en el modelo TPA que una disminución en la activación de la vía NF- $\kappa$ B inhibe una gran cantidad de mediadores inflamatorios como son las citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), moléculas de adhesión (ICAM Y VCAM), NO, COX-2, entre otras reduciendo el proceso inflamatorio y la generación de edema. Cabe señalar que el CA no solo podría tener efecto sobre los macrófagos o células endoteliales, talvez también podría generar efecto en otros tipos celulares. Es importante mencionar que CA podría estar funcionando como profármaco. Este compuesto, al interactuar con el medio de cultivo o cuando se administra tópicamente, podría estar reaccionando con las esterasas presentes, transformándolas en cacalol u otros compuestos que podrían ser los responsables del efecto, aunque se necesitan estudios farmacocinéticos futuros para corroborar esta teoría. De cualquier manera el hecho de que el CA interfiere con la via NF-KB entre IKK e IKB implica un mecanismo diferente al de antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos lo cual lo convierte un candidato interesante para su desarrollo como un antiinflamatorio alternativo.



**Figura 21.** Posible mecanismo de acción del CA.

## 11. CONCLUSIONES

- El CA reduce la expresión relativa del ARNm y las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en macrófagos activados con LPS.
- El CA reduce la expresión relativa del ARNm, la producción y la actividad de COX-2 en macrófagos activados con LPS.
- El CA disminuyó la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y disminuyó los niveles de fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y p65 en macrófagos activados con LPS.
- El CA reduce la expresión relativa del ARNm y la producción de ICAM y VCAM en células HUVEC activadas con LPS.
- El CA reduce producción de NO en HUVEC activadas con LPS.
- El CA disminuyó la adhesión celular de monocitos U-937 a células HUVEC activadas con LPS.
- El mecanismo de acción de CA ese encuentra entre el sustrato activo del complejo de las IKKs y el sustrato de I $\kappa$ B- $\alpha$ .

## 12. PERSPECTIVAS

- Análisis de modelaje molecular de CA sobre componentes del sistema NF-KB en donde se bloquea la transmisión de la señalización (IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ) como posibles blancos de AC.
- Valoración del efecto antiinflamatorio de CA en un modelo murino en el contexto de una inflamación local (TPA) y corroborar que la vía de señalización se bloquea en el mismo sitio que en modelo *in vitro*
- Valoración del efecto antiinflamatorio de CA en un modelo de choque séptico inducido por LPS, para valorar la disminución de la sintomatología marcadores moleculares inducidos en el choque séptico y la mortalidad.
- Valoración de posibles efectos secundarios en un modelo murino, enfocándose en los efectos adversos de otros antiinflamatorios comúnmente usados (aspirina, dexametasona, diclofenaco, etc.)



### 13. REFERENCIAS

- Abiodun, O. O., Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Utrilla, M. P., . . . Galvez, J. (2016). Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. *J Ethnopharmacol*, *192*, 309-319. doi:10.1016/j.jep.2016.07.056
- Ahn, S., Siddiqi, M. H., Aceituno, V. C., Simu, S. Y., & Yang, D. C. (2016). Suppression of MAPKs/NF-kappaB Activation Induces Intestinal Anti-Inflammatory Action of Ginsenoside Rf in HT-29 and RAW264.7 Cells. *Immunol Invest*, *45*(5), 439-449. doi:10.3109/08820139.2016.1168830
- Alarcon-Aguilar, F. J., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzalez-Paredes, B., Contreras, C. C., & Roman-Ramos, R. (2000). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol*, *69*(3), 207-215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722202>
- Alarcon-Aguilar, F. J., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., & Roman-Ramos, R. (2000). Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *J Ethnopharmacol*, *72*(1-2), 21-27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967449>
- Alarcon-Aguilar, F. J., Roman-Ramos, R., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzalez-Paredes, B., & Flores-Saenz, J. L. (1997). Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J Ethnopharmacol*, *55*(3), 171-177. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080337>
- Alves-Silva, J. M., Monica, Z., Carla, M., Ligia, S., & Henrique, G. (2016). Protective effects of terpenes on the cardiovascular system: Current advances and future perspectives. *Curr Med Chem*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27604093>
- Anaya, A. L., Hernandez-Bautista, B. E., Torres-Barragan, A., Leon-Cantero, J., & Jimenez-Estrada, M. (1996). Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (Asteraceae), matarique or maturin. *J Chem Ecol*, *22*(3), 393-403. doi:10.1007/BF02033643
- Andreas, K., Haupl, T., Lubke, C., Ringe, J., Morawietz, L., Wachtel, A., . . . Kaps, C. (2009). Antirheumatic drug response signatures in human chondrocytes: potential molecular targets to stimulate cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*, *11*(1), R15. doi:10.1186/ar2605

- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5276130. doi:10.1155/2016/5276130
- Bahl, A., Jachak, S. M., Palaniveloo, K., Ramachandram, T., Vairappan, C. S., & Chopra, H. K. (2014). 2-Acetoxyverecynarmin C, a new briarane COX inhibitory diterpenoid from *Pennatula aculeata*. *Nat Prod Commun*, 9(8), 1139-1141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233592>
- Bak, M. J., Truong, V. L., Kang, H. S., Jun, M., & Jeong, W. S. (2013). Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 409321. doi:10.1155/2013/409321
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*, 78(5), 431-441. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.012
- Barnes, P. J. (2016). Glucocorticosteroids. *Handb Exp Pharmacol*. doi:10.1007/164\_2016\_62
- Barrette AM1, R. J., Chapin C, Egan EA, Segal MR, Oses-Prieto JA, Chand S, Burlingame AL, Ballard PL1. (2016). Antiinflammatory Effects of Budesonide in Human Fetal Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 55(5), 623-632. doi:10.1165/rcmb.2016-0068OC
- Berk, K., Drygalski, K., Harasim-Symbor, E., Charytoniuk, T., Ilowska, N., Lukaszuk, B., . . . Konstantynowicz-Nowicka, K. (2019). The effect of enterolactone on liver lipid precursors of inflammation. *Life Sci*. doi:10.1016/j.lfs.2019.02.044
- Blackburn, D. F., Gill, M., Krol, E., & Taylor, J. (2017). Natural Health Products and Community Pharmacy-Remove the Mysticism Not the Product. *J Pharm Pract*, 30(6), 590-592. doi:10.1177/0897190017708074
- Branco, A., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J., & Sato, M. N. (2018). Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2018, 9524075. doi:10.1155/2018/9524075
- Brandenburg K, H. L., Correa W, Fukuoka S, Gutschmann T, Zähringer U, Koch MH. (2016). Supramolecular structure of enterobacterial wild-type lipopolysaccharides (LPS), fractions thereof, and their neutralization by Pep19-2.5. *J Struct Biol.* , 194(1), 68-77. doi:10.1016/j.jsb.2016.01.014
- Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Serhan, C. N., Stockinger, B., & Tak, P. P. (2013). The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 59-66. doi:10.1038/nri3362
- Campos, M. G., Oropeza, M., Torres-Sosa, C., Jimenez-Estrada, M., & Reyes-Chilpa, R. (2009). Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium*

- decompositum block ATP sensitive potassium channels. *J Ethnopharmacol*, 123(3), 489-493. doi:10.1016/j.jep.2009.03.003
- Castillo-Arellano, J. I., Gomez-Verjan, J. C., Rojano-Vilchis, N. A., Mendoza-Cruz, M., Jimenez-Estrada, M., Lopez-Valdes, H. E., . . . Arrieta-Cruz, I. (2018). Chemoinformatic Analysis of Selected Cacalolides from *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell and *Psacalium peltatum* (Kunth) Cass. and Their Effects on FcεRI-Dependent Degranulation in Mast Cells. *Molecules*, 23(12). doi:10.3390/molecules23123367
  - Castro, J. P., Ocampo, Y. C., & Franco, L. A. (2014). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Cryptostegia grandiflora* Roxb. ex R. Br. leaves. *Biol Res*, 47, 32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25204016>
  - Cervini-Silva, J., Nieto-Camacho, A., Palacios, E., Montoya, J. A., Gomez-Vidales, V., & Ramirez-Apan, M. T. (2013). Anti-inflammatory and anti-bacterial activity, and cytotoxicity of halloysite surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 111, 651-655. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.06.056
  - Chae, B. S. (2018). Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators. *Toxicol Res*, 34(1), 65-73. doi:10.5487/TR.2018.34.1.065
  - Cheekavolu, C., & Muniappan, M. (2016). In vivo and In vitro Anti-Inflammatory Activity of Indazole and Its Derivatives. *J Clin Diagn Res*, 10(9), FF01-FF06. doi:10.7860/JCDR/2016/19338.8465
  - Chen, S. R., Dai, Y., Zhao, J., Lin, L., Wang, Y., & Wang, Y. (2018). A Mechanistic Overview of Triptolide and Celastrol, Natural Products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Front Pharmacol*, 9, 104. doi:10.3389/fphar.2018.00104
  - Cheng, L., Ren, Y., Lin, D., Peng, S., Zhong, B., & Ma, Z. (2017). The Anti-Inflammatory Properties of *Citrus wilsonii* Tanaka Extract in LPS-Induced RAW 264.7 and Primary Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Molecules*, 22(7). doi:10.3390/molecules22071213
  - Cho, B. O., Ryu, H. W., So, Y., Cho, J. K., Woo, H. S., Jin, C. H., . . . Jeong, I. Y. (2013). Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from *Stevia rebaudiana* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 638-644. doi:10.1016/j.fct.2013.09.011
  - Cho, B. O., So, Y., Jin, C. H., Nam, B. M., Yee, S. T., & Jeong, I. Y. (2014). 3-deoxysilybin exerts anti-inflammatory effects by suppressing NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 78(12), 2051-2058. doi:10.1080/09168451.2014.948377

- Choodej, S., Pudhom, K., & Mitsunaga, T. (2018). Inhibition of TNF-alpha-Induced Inflammation by Sesquiterpene Lactones from *Saussurea lappa* and Semi-Synthetic Analogues. *Planta Med*, *84*(5), 329-335. doi:10.1055/s-0043-120115
- Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*, *54*(2), 281-288. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.030
- Chung, R. W. S., Leanderson, P., Lundberg, A. K., & Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, *262*, 87-93. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.008
- Cobos-Segarra, L., Lopez-Jaramillo, P., Ponte-Negretti Ci, C., Villar, R., & Penaherrera, E. (2018). Pharmacological Treatment of Hypertension: Effects in Endothelial Function. *Curr Hypertens Rev*, *14*(2), 123-127. doi:10.2174/1573402114666180508104828
- Correa, J., Romo, J., (1966). The constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray. Structures of , maturinin, matuton and maturinone. . *Tetrahedron*, *22*, 685-691.
- Csonka, C., Pali, T., Bencsik, P., Gorbe, A., Ferdinandy, P., & Csont, T. (2015). Measurement of NO in biological samples. *Br J Pharmacol*, *172*(6), 1620-1632. doi:10.1111/bph.12832
- Dai, B., Wei, D., Zheng, N. N., Chi, Z. H., Xin, N., Ma, T. X., . . . Sun, L. (2018). Cocomyxa Gloeobotrydiformis Polysaccharide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages. *Cell Physiol Biochem*, *51*(6), 2523-2535. doi:10.1159/000495922
- Decano, J. L., Mattson, P. C., & Aikawa, M. (2016). Macrophages in Vascular Inflammation: Origins and Functions. *Curr Atheroscler Rep*, *18*(6), 34. doi:10.1007/s11883-016-0585-2
- Du, Z. A., Sun, M. N., & Hu, Z. S. (2018). Saikosaponin a Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*, *41*(1), 193-198. doi:10.1007/s10753-017-0677-3
- Egbewande, F. A., Nilsson, N., White, J. M., Coster, M. J., & Davis, R. A. (2017). The design, synthesis, and anti-inflammatory evaluation of a drug-like library based on the natural product valerenic acid. *Bioorg Med Chem Lett*, *27*(14), 3185-3189. doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.021
- Feehan, K. T., & Gilroy, D. W. (2019). Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med*, *25*(3), 198-214. doi:10.1016/j.molmed.2019.01.006
- Ferrer, M. D., Busquets-Cortes, C., Capo, X., Tejada, S., Tur, J. A., Pons, A., & Sureda, A. (2019). Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem*, *26*(18), 3225-3241. doi:10.2174/0929867325666180514112124

- Filep, J. G. (2013). Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets. *Front Immunol*, 4, 256. doi:10.3389/fimmu.2013.00256
- Forloni, G., & Balducci, C. (2018). Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation. *J Alzheimers Dis*, 62(3), 1261-1276. doi:10.3233/JAD-170819
- Freire, M. O., & Van Dyke, T. E. (2013). Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000*, 63(1), 149-164. doi:10.1111/prd.12034
- Fritsche, K. L. (2015). The science of fatty acids and inflammation. *Adv Nutr*, 6(3), 293S-301S. doi:10.3945/an.114.006940
- Garg, N., Luzzatto-Knaan, T., Melnik, A. V., Caraballo-Rodriguez, A. M., Floros, D. J., Petras, D., . . . Phelan, V. V. (2017). Natural products as mediators of disease. *Nat Prod Rep*, 34(2), 194-219. doi:10.1039/c6np00063k
- Garg, R., Ramchandani, A. G., & Maru, G. B. (2008). Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. *Carcinogenesis*, 29(6), 1249-1257. doi:10.1093/carcin/bgn114
- Gautam, R., Jachak, S. M., & Saklani, A. (2011). Anti-inflammatory effect of *Ajuga bracteosa* Wall Ex Benth. mediated through cyclooxygenase (COX) inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 928-930. doi:10.1016/j.jep.2010.11.003
- Gopalsamy, B., Farouk, A. A. O., Tengku Mohamad, T. A. S., Sulaiman, M. R., & Perimal, E. K. (2017). Antiallodynic and antihyperalgesic activities of zerumbone via the suppression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in a mouse model of neuropathic pain. *J Pain Res*, 10, 2605-2619. doi:10.2147/JPR.S143024
- Harjunpaa, H., Llort Asens, M., Guenther, C., & Fagerholm, S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 1078. doi:10.3389/fimmu.2019.01078
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 16(6), 358-372. doi:10.1038/nrn3880
- Hoppstadter, J., Hachenthal, N., Valbuena-Perez, J. V., Lampe, S., Astanina, K., Kunze, M. M., . . . Kiemer, A. K. (2016). Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Contributes to Anti-inflammatory Effects of the Natural Product Curcumin in Macrophages. *J Biol Chem*, 291(44), 22949-22960. doi:10.1074/jbc.M116.733253
- Huang, M. H., Wang, B. S., Chiu, C. S., Amagaya, S., Hsieh, W. T., Huang, S. S., . . . Huang, G. J. (2011). Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory

activities of Xanthii Fructus extract. *J Ethnopharmacol*, 135(2), 545-552. doi:10.1016/j.jep.2011.03.057

- Ip, W. K., & Medzhitov, R. (2015). Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun*, 6, 6931. doi:10.1038/ncomms7931
- Jain, H., Dhingra, N., Narsinghani, T., & Sharma, R. (2016). Insights into the mechanism of natural terpenoids as NF-kappaB inhibitors: an overview on their anticancer potential. *Exp Oncol*, 38(3), 158-168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27685522>
- Jantsch, J., Binger, K. J., Muller, D. N., & Titze, J. (2014). Macrophages in homeostatic immune function. *Front Physiol*, 5, 146. doi:10.3389/fphys.2014.00146
- Jiménez-Estada, M., Lozano, C., Valdés, M.J., Alarcón, G., Sveshtarova, B. . (1992). Actividad antimicrobiana del cacalol y sus derivados. . *Latinoam Quim*, 23, 1-22.
- Jimenez-Estrada, M., Chilpa, R. R., Apan, T. R., Lledias, F., Hansberg, W., Arrieta, D., & Aguilar, F. J. (2006). Anti-inflammatory activity of cacalol and cacalone sesquiterpenes isolated from *Psacalium decompositum*. *J Ethnopharmacol*, 105(1-2), 34-38. doi:10.1016/j.jep.2005.09.039
- Jimenez-Estrada, M., Merino-Aguilar, H., Lopez-Fernandez, A., Rojano-Vilchis, N. A., Roman-Ramos, R., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2011). Chemical characterization and evaluation of the hypoglycemic effect of fructooligosaccharides from *Psacalium decompositum*. *J Complement Integr Med*, 8. doi:10.2202/1553-3840.1413
- Jones, H. R., Robb, C. T., Perretti, M., & Rossi, A. G. (2016). The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol*, 28(2), 137-145. doi:10.1016/j.smim.2016.03.007
- Kawata, A., Murakami, Y., Suzuki, S., & Fujisawa, S. (2018). Anti-inflammatory Activity of beta-Carotene, Lycopene and Tri-n-butylborane, a Scavenger of Reactive Oxygen Species. *In Vivo*, 32(2), 255-264. doi:10.21873/invivo.11232
- Khan, A. Q., Khan, R., Rehman, M. U., Lateef, A., Tahir, M., Ali, F., & Sultana, S. (2012). Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF-kappaB in Swiss albino mice. *Toxicology*, 302(2-3), 266-274. doi:10.1016/j.tox.2012.08.008
- Kim, E. J., Lee, M. Y., & Jeon, Y. J. (2015). Silymarin Inhibits Morphological Changes in LPS-Stimulated Macrophages by Blocking NF-kappaB Pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*, 19(3), 211-218. doi:10.4196/kjpp.2015.19.3.211

- Kishore, N., Kumar, P., Shanker, K., & Verma, A. K. (2019). Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. *Eur J Med Chem*, 179, 272-309. doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.034
- Kong, Y. H., & Xu, S. P. (2018). Salidroside prevents skin carcinogenesis induced by DMBA/TPA in a mouse model through suppression of inflammation and promotion of apoptosis. *Oncol Rep*, 39(6), 2513-2526. doi:10.3892/or.2018.6381
- Kotas, M. E., & Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160(5), 816-827. doi:10.1016/j.cell.2015.02.010
- Kratochvil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2016). Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308198
- Kwon, D. H. K. O. H. K. Z. L. S. H. M. Y. S. S. R. K. Z. T. X. L. D. Y. (2016). Anti-inflammatory effects of Ciwujianoside C3, extracted from the leaves of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms, on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Mol Med Rep*, 14(4), 3749-3758. doi:10.3892/mmr.2016.5710
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
- Lawrence, T., & Fong, C. (2010). The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(4), 519-523. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.016
- Lee, S. Y., Kim, H. J., & Han, J. S. (2013). Anti-inflammatory Effect of Oyster Shell Extract in LPS-stimulated Raw 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci*, 18(1), 23-29. doi:10.3746/pnf.2013.18.1.023
- Li, Y., Zhu, H., Wei, X., Li, H., Yu, Z., Zhang, H., & Liu, W. (2017). LPS induces HUVEC angiogenesis in vitro through miR-146a-mediated TGF-beta1 inhibition. *Am J Transl Res*, 9(2), 591-600. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337286>
- Linares, E., & Bye, R. A., Jr. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J Ethnopharmacol*, 19(2), 153-183. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3613608>
- Liu, X., Moon, S. H., Jenkins, C. M., Sims, H. F., & Gross, R. W. (2016). Cyclooxygenase-2 Mediated Oxidation of 2-Arachidonoyl-Lysophospholipids Identifies Unknown Lipid Signaling Pathways. *Cell Chem Biol*, 23(10), 1217-1227. doi:10.1016/j.chembiol.2016.08.009
- Lon, H. K., Liu, D., & Jusko, W. J. (2012). Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(4), 295-312. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23140121>

- Matsuzawa-Ishimoto, Y., Hwang, S., & Cadwell, K. (2018). Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol*, 36, 73-101. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053253
- Medler, J., & Wajant, H. (2019). Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets*. doi:10.1080/14728222.2019.1586886
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. doi:10.1038/nature07201
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776. doi:10.1016/j.cell.2010.03.006
- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*, 9(10), 692-703. doi:10.1038/nri2634
- Medzhitov, R., & Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 173, 89-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719670>
- Merino-Aguilar, H., Arrieta-Baez, D., Jimenez-Estrada, M., Magos-Guerrero, G., Hernandez-Bautista, R. J., Susunaga-Notario Adel, C., . . . Alarcon-Aguilar, F. J. (2014). Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients*, 6(2), 591-604. doi:10.3390/nu6020591
- Mitchell, J. A., & Kirkby, N. S. (2018). Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.14167
- Moreira Lopes, T. C., Mosser, D. M., & Goncalves, R. (2020). Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. *Inflamm Res*, 69(12), 1163-1172. doi:10.1007/s00011-020-01398-y
- Nakatake, R., Tsuda, T., Matsuura, T., Miki, H., Hishikawa, H., Matsushima, H., . . . Kon, M. (2017). Genipin Inhibits the Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Through the Inhibition of NF-kappaB Activation in Rat Hepatocytes. *Drug Metab Lett*, 10(4), 254-263. doi:10.2174/1872312810666161020164658
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029
- Nonnenmacher, Y., & Hiller, K. (2018). Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-018-2784-1
- Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66(2), 127-132. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016



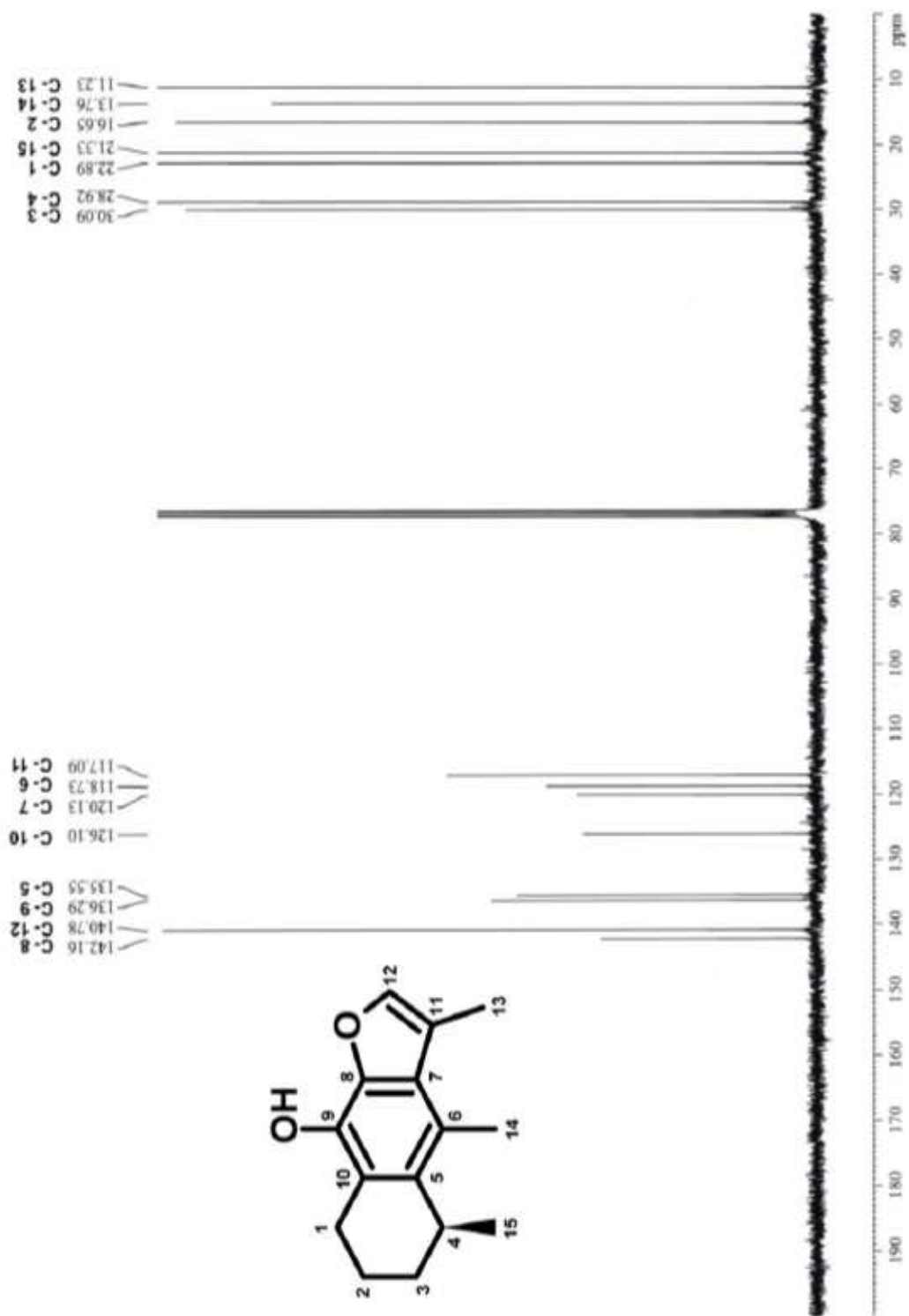
- Oliviero, F., Scanu, A., Zamudio-Cuevas, Y., Punzi, L., & Spinella, P. (2018). Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *J Sci Food Agric*, 98(5), 1653-1659. doi:10.1002/jsfa.8664
- Palsson-McDermott, E. M., & O'Neill, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2), 153-162. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x
- Park, Y. D., Jin, C. H., Choi, D. S., Byun, M. W., & Jeong, I. Y. (2011). Biological evaluation of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* and its synthetic derivatives as anti-inflammatory agents. *Arch Pharm Res*, 34(8), 1277-1282. doi:10.1007/s12272-011-0806-8
- Passos, G. F., Medeiros, R., Marcon, R., Nascimento, A. F., Calixto, J. B., & Pianowski, L. F. (2013). The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*, 698(1-3), 413-420. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.019
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7(10), 803-815. doi:10.1038/nri2171
- Rakariyatham, K., Du, Z., Yuan, B., Gao, Z., Song, M., Pan, C., . . . Xiao, H. (2019). Inhibitory effects of 7,7'-bromo-curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation. *Eur J Pharmacol*, 858, 172479. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172479
- Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Alexander, H. D., & Ross, O. A. (2018). Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*, 9, 586. doi:10.3389/fimmu.2018.00586
- Sato, Y., & Yanagita, M. (2018). Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. *Am J Physiol Renal Physiol*, 315(6), F1501-F1512. doi:10.1152/ajprenal.00195.2018
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., . . . Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233(9), 6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
- Shen, J., Abu-Amer, Y., O'Keefe, R. J., & McAlinden, A. (2017). Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*, 58(1), 49-63. doi:10.1080/03008207.2016.1208655
- Siczek, K., Zatorski, H., Chmielowiec-Korzeniowska, A., Pulit-Prociak, J., Smiech, M., Kordek, R., . . . Fichna, J. (2016). Synthesis and evaluation of anti-inflammatory properties of silver nanoparticle suspensions in experimental colitis in mice. *Chem Biol Drug Des*. doi:10.1111/cbdd.12876

- Siddiqui, F., Naqvi, S., Abidi, L., Faizi, S., Lubna, Avesi, L., . . . Farooq, A. D. (2016). *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation. *J Ethnopharmacol*, *182*, 221-234. doi:10.1016/j.jep.2016.02.016
- Siddiqui, K., George, T. P., Nawaz, S. S., & Joy, S. S. (2019). VCAM-1, ICAM-1 and selectins in gestational diabetes mellitus and the risk for vascular disorders. *Future Cardiol*, *15*(5), 339-346. doi:10.2217/fca-2018-0042
- Simpson, B. S., Luo, X., Wang, J., Song, Y., Claudie, D., Garg, S., . . . Semple, S. (2015). Development and Evaluation of a Topical Anti-Inflammatory Preparation Containing *Dodonaea polyandra* Extract. *J Pharm Pharm Sci*, *18*(4), 578-599. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26626250>
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., & Pujari, V. B. (2019). Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*, *18*(3), 121-126. doi:10.4103/aam.aam\_56\_18
- Staniek, A., Bouwmeester, H., Fraser, P. D., Kayser, O., Martens, S., Tissier, A., . . . Warzecha, H. (2013). Natural products - modifying metabolite pathways in plants. *Biotechnol J*, *8*(10), 1159-1171. doi:10.1002/biot.201300224
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, *107*(1), 7-11. doi:10.1172/JC111830
- Theoduloz, C., Delporte, C., Valenzuela-Barra, G., Silva, X., Cadiz, S., Bustamante, F., . . . Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Topical Anti-inflammatory Activity of New Hybrid Molecules of Terpenes and Synthetic Drugs. *Molecules*, *20*(6), 11219-11235. doi:10.3390/molecules200611219
- Thompson, P. A., Ashbeck, E. L., Roe, D. J., Fales, L., Buckmeier, J., Wang, F., . . . Lance, P. (2016). Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomas: Results of a Suspended Randomized Controlled Trial. *J Natl Cancer Inst*, *108*(12). doi:10.1093/jnci/djw151
- Tornatore, L., Thotakura, A. K., Bennett, J., Moretti, M., & Franzoso, G. (2012). The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol*, *22*(11), 557-566. doi:10.1016/j.tcb.2012.08.001
- Tsukamoto, H., Fukudome, K., Takao, S., Tsuneyoshi, N., & Kimoto, M. (2010). Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol*, *22*(4), 271-280. doi:10.1093/intimm/dxq005
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.

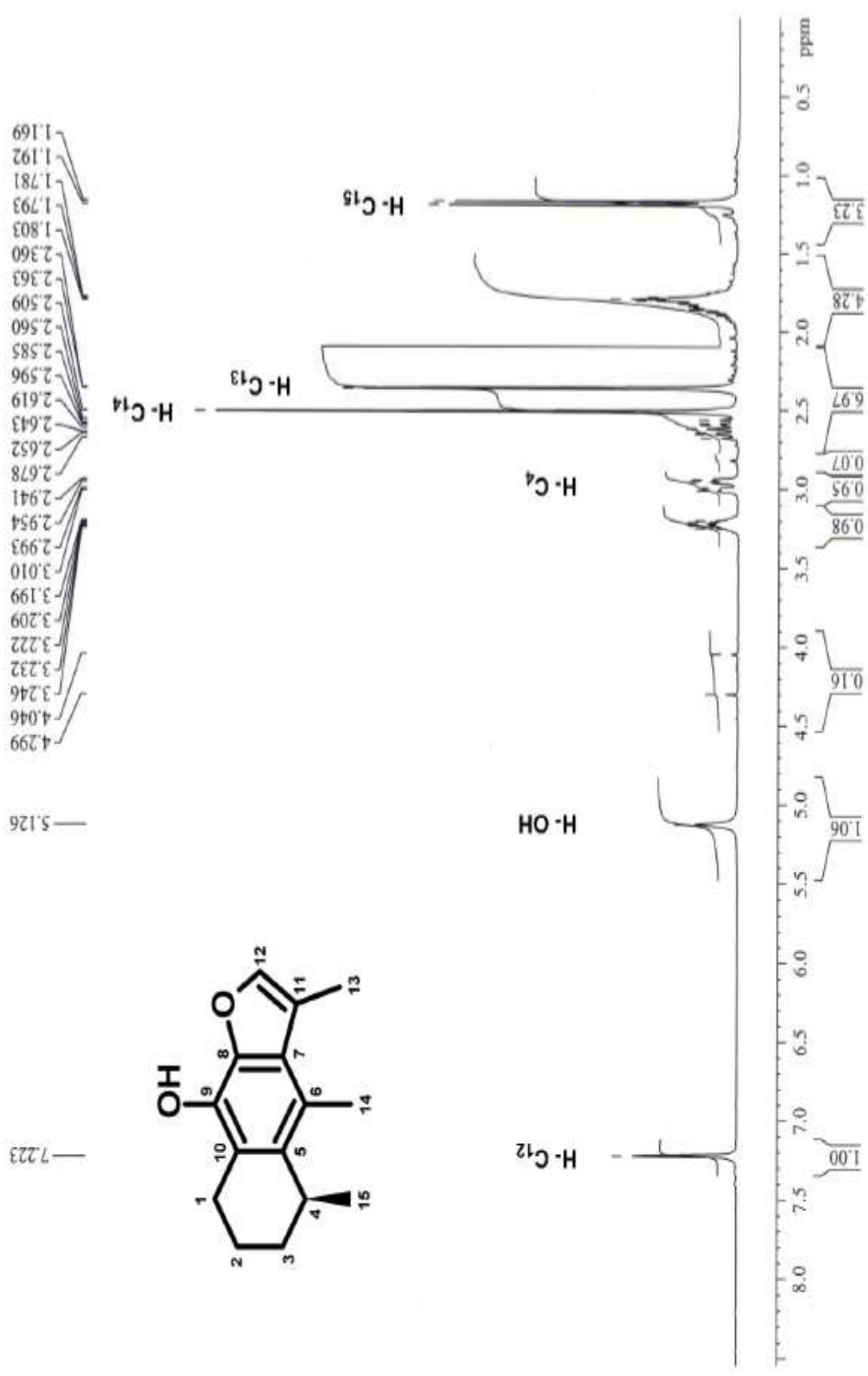
*Biochim Biophys Acta*, 1843(11), 2563-2582.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014

- Tursi, A., & Elisei, W. (2019). Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diverticular Disease. *Mediators Inflamm*, 2019, 8328490. doi:10.1155/2019/8328490
- Watanabe, K., & Jaffe, E. A. (1993). Comparison of the potency of various serotypes of E. coli lipopolysaccharides in stimulating PGI<sub>2</sub> production and suppressing ACE activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 49(6), 955-958. doi:10.1016/0952-3278(93)90181-u
- Woodward, D. F., Wang, J. W., Ni, M., Bauer, A., Martos, J. L., Carling, R. W., & Poloso, N. J. (2016). In vivo studies validating multitargeting of prostanoid receptors for achieving superior anti-inflammatory effects. *FASEB J*. doi:10.1096/fj.201600604R
- Wyns, H., Plessers, E., De Backer, P., Meyer, E., & Croubels, S. (2015). In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Vet Immunol Immunopathol*, 166(3-4), 58-69. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.001
- Yang, X., Chang, Y., & Wei, W. (2016). Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm*, 2016, 6813016. doi:10.1155/2016/6813016
- Zhang, H., & Chen, W. (2017). Interleukin 6 inhibition by triptolide prevents inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *Exp Ther Med*, 14(3), 2271-2276. doi:10.3892/etm.2017.4778
- Zwicker, P., Schultze, N., Niehs, S., Albrecht, D., Methling, K., Wurster, M., . . . Haertel, B. (2017). Differential effects of Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone, on the proteome, metabolome and the oxidative stress response in several immune cell types. *Toxicol In Vitro*, 40, 45-54. doi:10.1016/j.tiv.2016.12.010

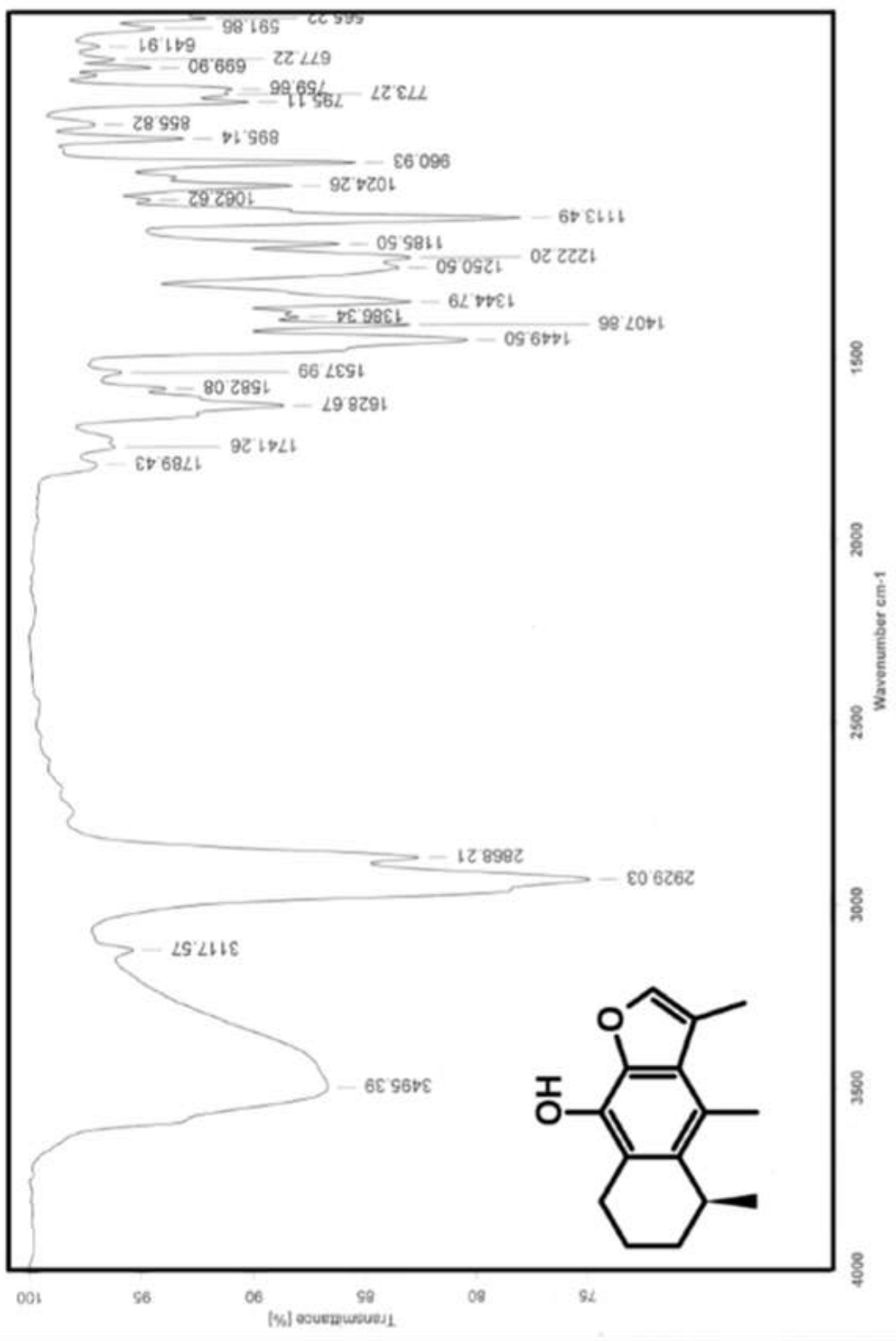
## 14. ANEXOS



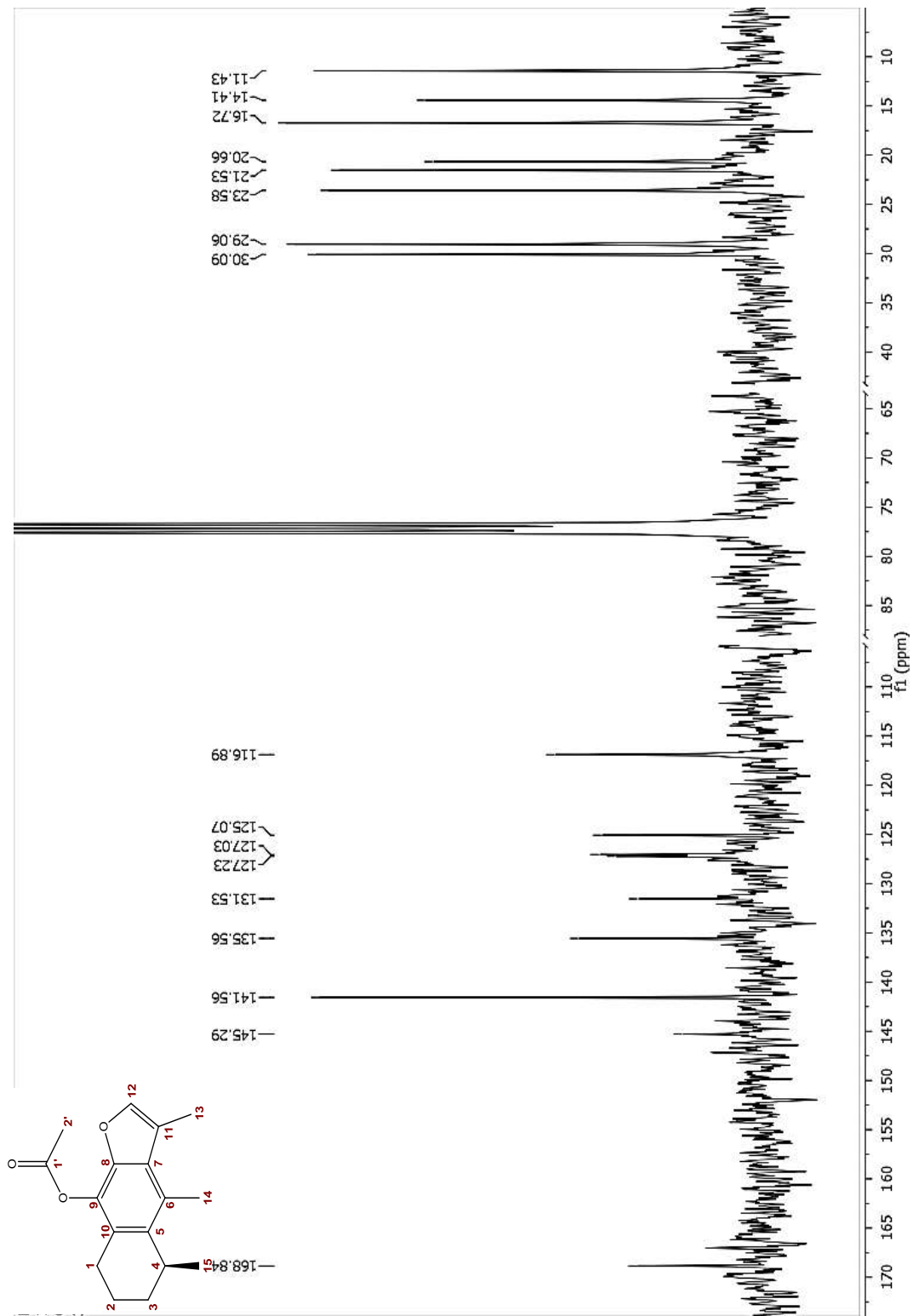
Anexo 1.1 Espectro de <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) de cacalol



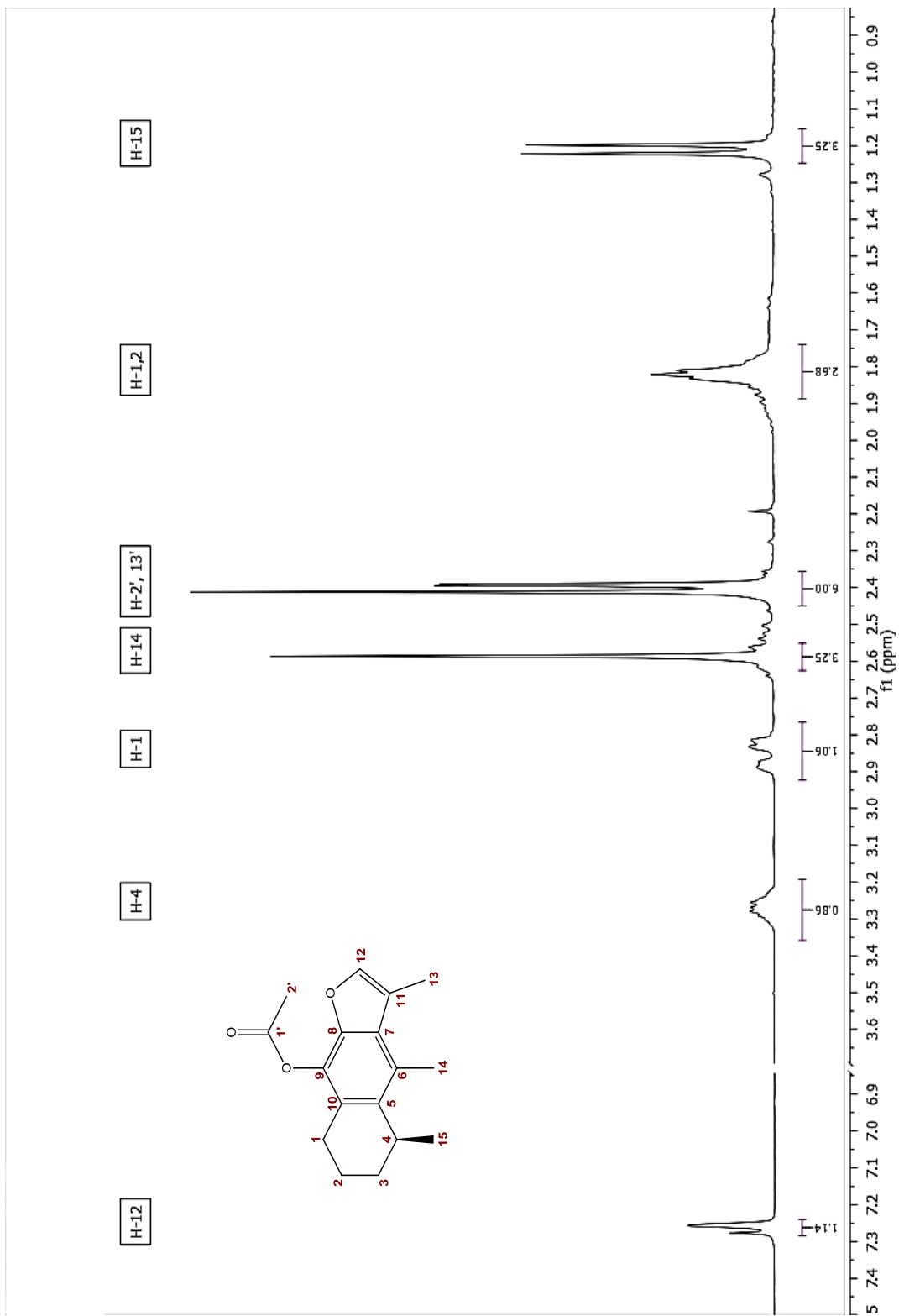
Anexo 1.2 Espectro de <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) de cacalol



Anexo 1.3 Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>, disolución) de cacalol

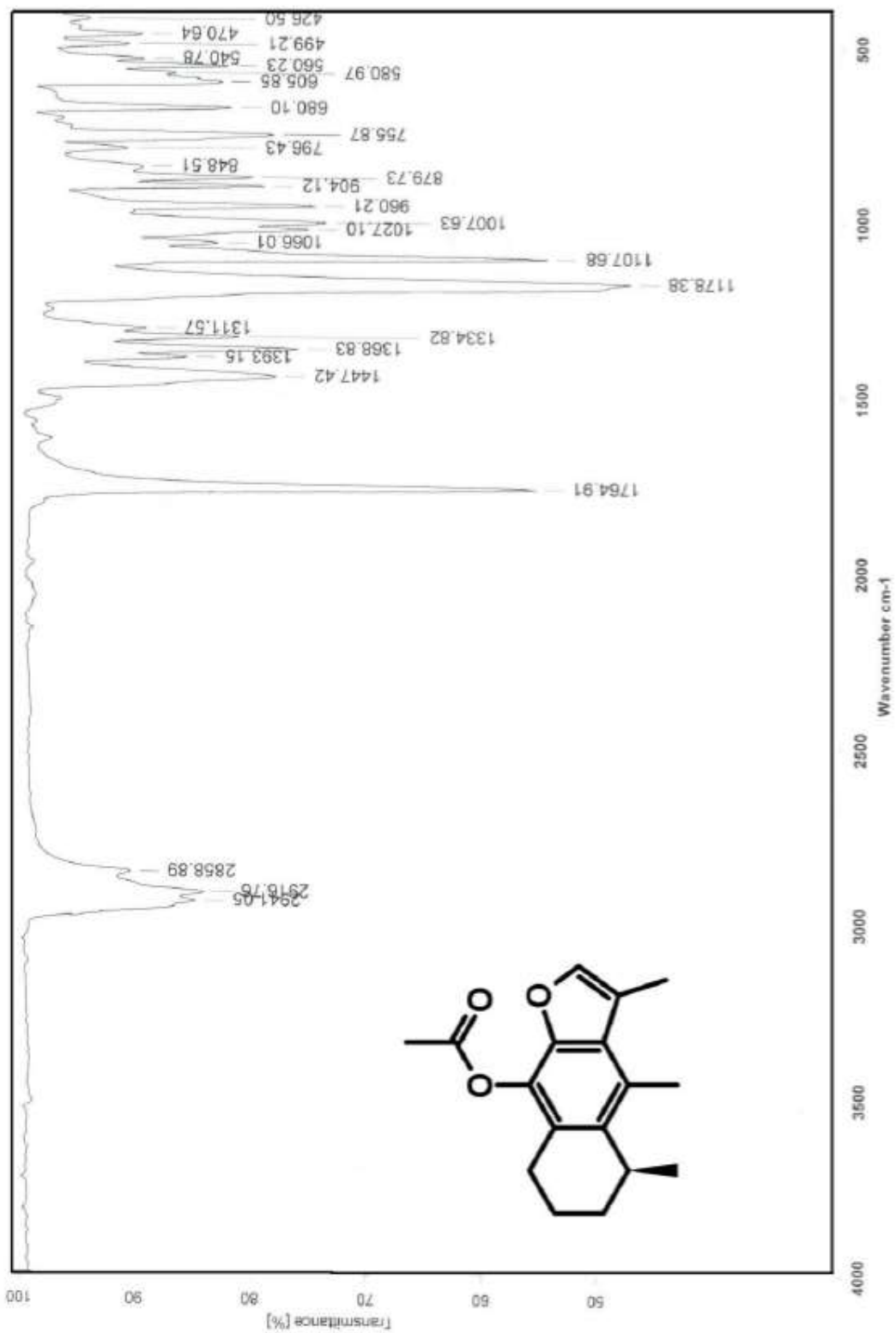


**Anexo 1.4** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) de acetato de cacalol



**Anexo 1.5** Espectro de <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) de acetato de cacalol





Anexo 1.6 Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>, disolución) de acetato de cacalol

## Cacalol Acetate, a Sesquiterpene from *Psacalium decompositum*, Exerts an Anti-inflammatory Effect through LPS/NF- $\kappa$ B Signaling in Raw 264.7 Macrophages

B. Mora-Ramiro, M. Jiménez-Estrada, A. Zentella-Dehesa, J. L. Ventura-Gallegos, L. E. Gomez-Quiroz, W. Rosiles-Alanis, F. J. Alarcón-Aguilar, and J. C. Almanza-Pérez\*

Cite This: *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 2447–2455

Read Online

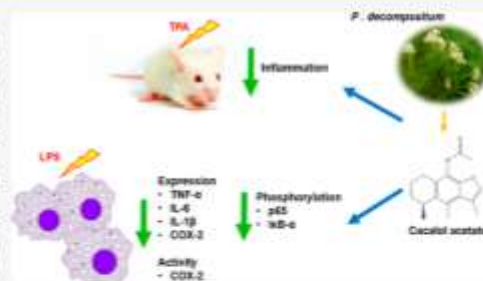
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Inflammatory diseases remain critical health problems worldwide. The search for anti-inflammatory drugs is a primary activity in the pharmaceutical industry. Cacalol is a sesquiterpene with anti-inflammatory potential that is isolated from *Psacalium decompositum*, a medicinal plant with several scientific reports supporting its anti-inflammatory activity. Cacalol acetate (CA) is the most stable form. Nevertheless, the participation of CA in the main signaling pathway associated with inflammation is unknown. Our aim was to study the anti-inflammatory effect of CA and to determine its participation in NF- $\kappa$ B signaling. In TPA-induced edema in mice, CA produced 70.3% inhibition. To elucidate the influence of CA on the NF- $\kappa$ B pathway, RAW 264.7 macrophages were pretreated with CA and then stimulated with LPS, evaluating NF- $\kappa$ B activation, IKK phosphorylation, I $\kappa$ B- $\alpha$ , p65, cytokine expression, and COX-2 release and activity. CA inhibited NF- $\kappa$ B activation and its upstream signaling, decreasing phosphorylation I $\kappa$ B- $\alpha$  and p65 levels. CA also reduced expression and secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. Additionally, it decreased the activity and expression of COX-2 mRNA. These data support that CA regulates the NF- $\kappa$ B signaling pathway, which might explain, at least in part, its anti-inflammatory effect. CA is a bioactive molecule useful for the development of anti-inflammatory agents with innovative mechanisms of action.



Inflammation is a natural biological response that is triggered by noxious stimuli (microbial infections, chemical agents, and immune reactions), directed towards eliminating harmful agents and restoration of the normal function of the affected tissue or organ.<sup>1–4</sup> According to its origin and extent, inflammation could be acute or chronic. Acute inflammation occurs within the span of minutes to hours, and the alteration produced in inflammatory mediators could last a few days, whereas chronic inflammation could last for several months.<sup>5,6</sup> Chronic inflammation is associated with the pathogenesis of several diseases, including rheumatoid arthritis, obesity, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes, Crohn's disease, and cancer.<sup>7,8</sup>

Macrophages are critical cells in the inflammatory process. These cells are involved in the clearance of foreign materials, invasive bacteria, defective cells, and debris produced by tissue damage.<sup>6,9</sup> Some particular macrophages residing in specific tissues express a variety of pattern recognition receptors (PRRs), which specifically recognize foreign agents, such as Toll-like receptors (TLRs). Different stimuli such as the lipopolysaccharide (LPS),<sup>10–12</sup> a Gram-negative bacterial endotoxin, activate the TLR4 on macrophages and stimulate the recruitment of cytoplasmic adaptor proteins (MyD88 and

TRIF). The binding of these adaptor proteins to the TLR4 complex triggers nuclear factor-kappa beta (NF- $\kappa$ B) activation.<sup>13–15</sup>

NF- $\kappa$ B is a ubiquitous nuclear transcription factor that regulates the expression of several genes, playing pivotal roles in inflammation, autoimmune diseases, apoptosis and carcinogenesis.<sup>1,16</sup> p50/p65 is the principal NF- $\kappa$ B heterodimer in nonstimulated cells linked to a family of inhibitory proteins, I $\kappa$ B, which maintain the heterodimer inactive in the cytoplasm. LPS stimulation activates I $\kappa$ B kinases (IKKs), which are responsible for the phosphorylation of two specific serine residues (Ser32 and Ser36) in I $\kappa$ B- $\alpha$ , leading to ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome.<sup>10,11,17</sup> The NF- $\kappa$ B heterodimer is released and translocated into the nucleus, where it binds to specific I $\kappa$ B- $\alpha$  response elements in

Received: March 28, 2020  
Published: July 16, 2020



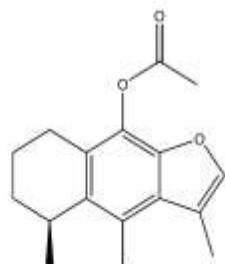
the promoter region of target genes, activating their transcription.

The cellular responses mediated by NF- $\kappa$ B induce the production of inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and cyclooxygenase-2 (COX-2), an enzyme that uses arachidonic acid (AA) as a substrate to transform it into prostaglandins (PGs), among others.<sup>15,17,18</sup> The inflammatory response is the result of the complex interaction of all of these molecules, and their prolonged presence could exacerbate the inflammatory process, leading to a chronic condition.

Anti-inflammatory drugs, such as steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs),<sup>19–21</sup> are the primary therapeutic approach in many inflammation-related diseases. Although a large number of synthetic anti-inflammatory drugs have arisen in past decades, these often cause adverse effects after prolonged treatment, particularly in gastrointestinal disorders and altered humoral immunodeficiency.<sup>22,23</sup> Therefore, the search for new anti-inflammatory drugs with higher efficacy and lower toxicity is mandatory.<sup>21,24</sup>

Plants provide a large number of secondary metabolites with several biological activities.<sup>25–27</sup> Some of these natural metabolites are flavonoids, glycosides, phenols, and terpenes. Terpenes are the most abundant and most widespread class associated with multiple pharmacological activities, such as antioxidant and antiproliferative, with the ability to modulate the cell signaling pathways involved in inflammation, such as artemisinin and lycopene, which inhibit the DNA binding of NF- $\kappa$ B, and others, such as genipin, triptolide, catalposide, among others, which are inhibitors of I $\kappa$ B- $\alpha$ .<sup>18,25,28,29</sup>

*Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell (*Gray*) (syn.: *Cacalia decomposita* A. Gray, Asteraceae) is a medicinal plant distributed in northern Mexico and the southwestern U.S. In traditional medicine, roots and rhizomes are employed for general pain, rheumatism, kidney, liver, and gastrointestinal disorders and as an antidiabetic remedy.<sup>30,31</sup> In addition, this plant is bactericidal, fungicidal, antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory.<sup>30–32</sup> Phytochemical studies revealed that *P. decompositum* contains several sesquiterpene compounds (furanoterpenes), such as cacalol, cacalona, maturine, matorinone, and matorone.<sup>33,34</sup>



Cacalol acetate

Cacalol was reported to possess an anti-inflammatory effect by the inhibition of edema in carrageenan and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) models.<sup>33</sup> It has been reported that the acetylated form of this compound (cacalol acetate) is the most stable of these, although the anti-inflammatory effect of this derivative and its influence on the NF- $\kappa$ B signaling pathway is unknown. This study aimed to

evaluate the anti-inflammatory effect of cacalol acetate (CA) and to determine its potential modulator effect on the NF- $\kappa$ B signaling pathway, following LPS-induced activation of RAW 264.7 macrophages.

## RESULTS AND DISCUSSION

Traditional medicine and natural products play an essential role in human health, focusing on the prevention and treatment of various diseases, including inflammatory diseases. Terpenes may be considered an excellent alternative for designing new compounds with anti-inflammatory activity. Cacalol is a terpene that displayed anti-inflammatory activity in the TPA and carrageenan model, generating 60% inhibition in edema.<sup>33</sup> This compound tends to be easily oxidized in its phenol group, becoming less stable. An alternative to avoid this is to acetylate the phenol group, resulting in cacalol acetate, which is a stable compound.<sup>33,35</sup> Cacalol is a beige solid, with a melting point of 105–106 °C and  $R_f$  0.63 in HxOEt (8:2), which coincides with previous studies.<sup>36</sup>

The <sup>1</sup>H NMR spectra showed, at 2.39 ppm, a signal belonging to hydrogen bound to C-13, while, at 2.59 ppm, there was a signal for hydrogens bound to C-14 corresponding to the methyl bound to the phenol group and at 2.39 ppm the protons attached to the C-13 belonging to the methyl linked to the furan ring. The hydrogen signal of the furan group at 7.22 ppm was also evident. Additionally, the methyl protons of the acetate group corroborated the cacalol acetylation (Supporting Information).

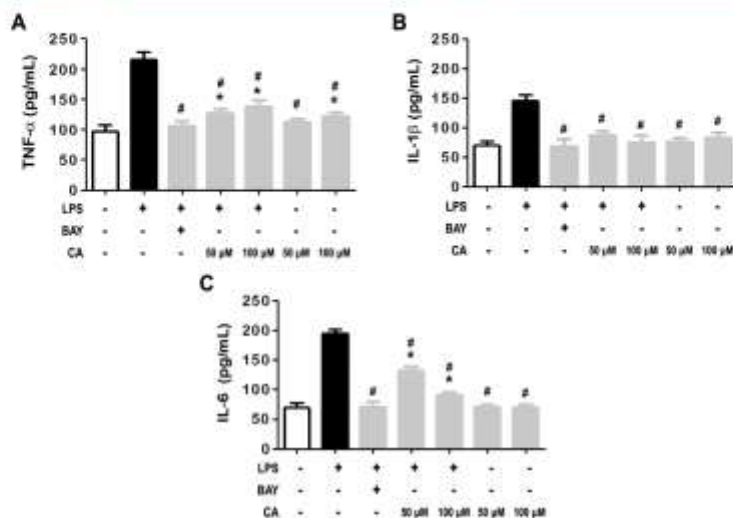
As already reported, Cacalol inhibited TPA-induced ear inflammation in mice; however, to our knowledge, there are no reports concerning the effect of CA on inflammation models.<sup>33</sup> This work is, to our knowledge, the first report on the anti-inflammatory effect of CA on the TPA model. The mechanism of TPA involves protein kinase C (PKC) and phospholipase A2 (PLA2) activation, as well as arachidonic acid release, a PG and leukotriene (LT) precursor, which act as vasodilators and facilitate the development of edema.<sup>37,38</sup> Table 1 presents the

**Table 1.** Anti-inflammatory Activity of Compounds Isolated from the Hexane Extract of *P. decompositum* on TPA-Induced Mouse Ear Edema

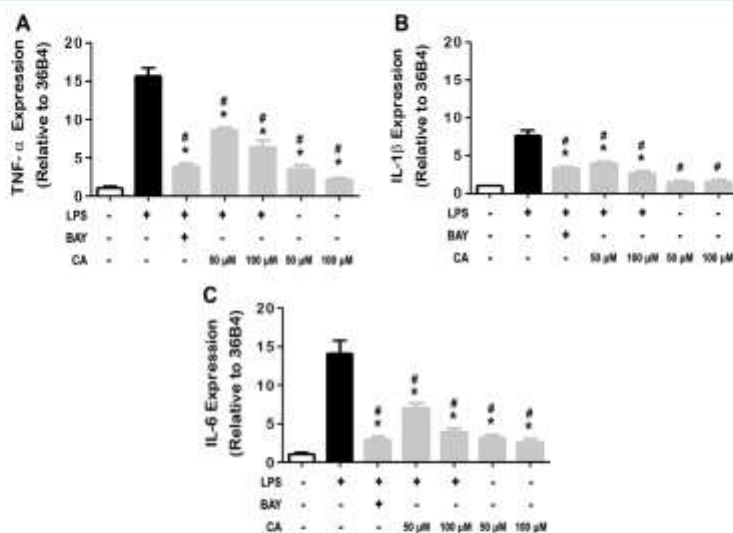
group	dose	weight of ears (mg) ± SEM	percentage inhibition of edema
TPA + CH <sub>2</sub> (CO)CH <sub>3</sub>	2.5 $\mu$ g/ear	16.62 ± 0.8	
cacalol	1 mg/ear	8.55 ± 0.8	48.5
cacalol acetate	1 mg/ear	6.56 ± 0.9	70.3 <sup>a</sup>
indomethacin	1 mg/ear	4.05 ± 0.9	78.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*p* < 0.05.

percentages of edema inhibition on the TPA model. CA produced edema inhibition, even more than the cacalol treatment, in that the cacalol only inhibited 48.5% and CA up to 70.3%, generating a statistically significant difference of 21.8% between the two groups. CA probably inhibits the synthesis pathway of lipid mediators and PLA2, similar to steroidal anti-inflammatory drugs, or generates an effect on COX-2 similar to that produced by an NSAID. CA could also be generating changes in the expression of some genes such as COX-2 or PLA2, or certain other inflammatory mediators such



**Figure 1.** Effect of CA on the secretion of inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M). The medium was removed and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 3 h; at the end of this time, the culture medium was collected and TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-6 (C) were quantified by ELISA. Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. <sup>a</sup> $p$  < 0.05 compared to control; <sup>b</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.

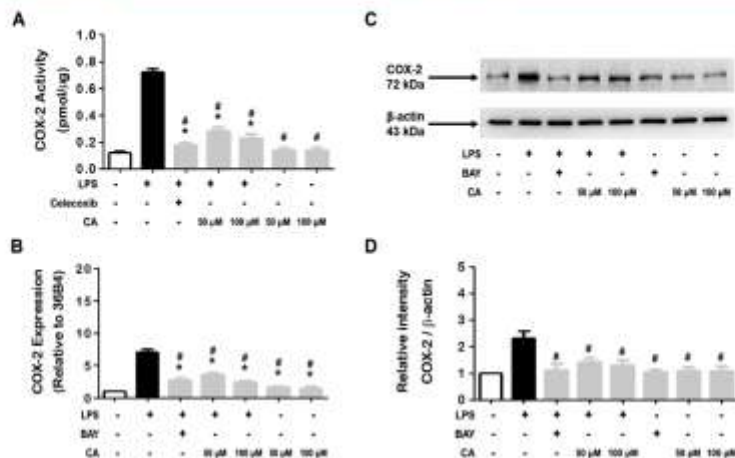


**Figure 2.** Effect CA on the expression of inflammatory cytokines in RAW264.7 cells stimulated with LPS. RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M). The medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 90 min; after isolating the total RNA, the relative expression of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-6 (C) was quantified by RT-qPCR. Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. <sup>a</sup> $p$  < 0.05 compared to control; <sup>b</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.

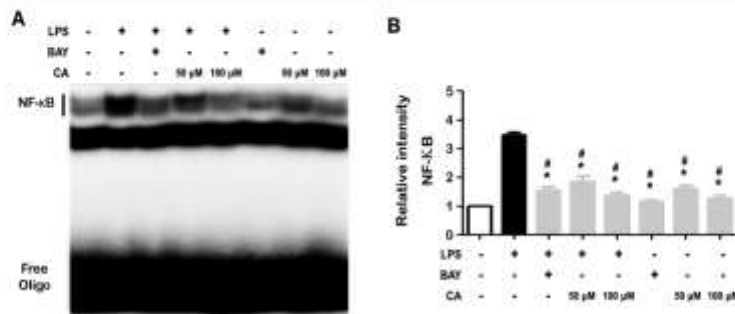
as cytokines, or could be intervening in the production of NO, which would also generate the inhibition of edema.<sup>17,39–41</sup>

Macrophages play a crucial role in the initiation and perpetuation of the inflammatory response, which is why we decided to use RAW264.7 cell line macrophages, which is the most widely of those employed as a model of inflammation *in vitro*.<sup>42</sup> LPS activates NF- $\kappa$ B in macrophages, inducing the

expression of inflammatory genes, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, among these.<sup>17,43</sup> These are key mediators in the pathophysiology of the majority of inflammatory diseases; they induce increased levels of the expression of adhesion molecules and trigger the production of reactive oxygen species (ROS), generating tissue damage.<sup>16,44–46</sup>



**Figure 3.** Effect of CA on COX-2 activity, expression, and production in RAW264.7 cells stimulated with LPS. RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M), Celecoxib (10  $\mu$ M), or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); the medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 90 min to measure expression and during 3 h to measure activity and protein content. COX-2 enzyme activity was determined by fluorimetric assay (A). Relative COX-2 expression was quantified by RT-qPCR (B). Protein content was evaluated by Western blot (C), and band intensities were measured by densitometry and normalized with  $\beta$ -actin (D). Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. <sup>a</sup> $p$  < 0.05 compared to control; <sup>b</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.



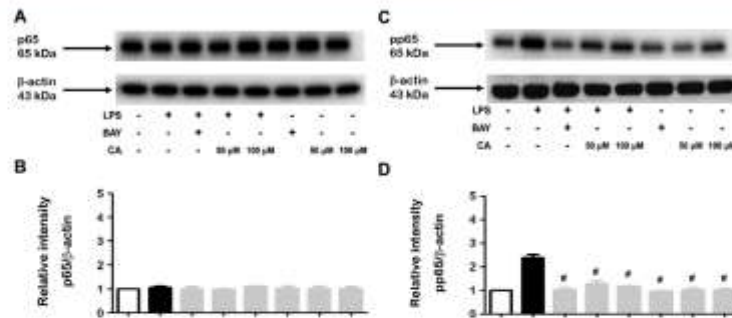
**Figure 4.** Effects of CA on the translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus induced by LPS in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); the medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 25 min. Then nuclear protein extraction was performed. NF- $\kappa$ B translocation was assessed by an EMSA assay on a 7.5% acrylamide gel with probes labeled for NF- $\kappa$ B (A). NF- $\kappa$ B translocation was calculated by densitometry analysis of the bands on the gel (B). Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. <sup>a</sup> $p$  < 0.05 compared to control; <sup>b</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.

CA was first evaluated on the transcriptional regulation of these pro-inflammatory cytokines in response to stimulation with LPS. Mere stimulation with LPS increased by 2-fold the expression and secretion of these cytokines, while the treatments with CA (100  $\mu$ M) and BAY 11-7085 (irreversible inhibitor IKK- $\alpha$ ) administered before stimulation markedly attenuated it by more than 50% compared to control<sup>17</sup> (Figures 1 and 2). Inhibition of these cytokines represents an effective treatment strategy for inflammatory diseases and tissue damage, for example, in rheumatoid arthritis, in which there is an excessive production of TNF- $\alpha$  and IL-1- $\beta$  that generates cartilage and bone destruction through the increase in metalloproteinases. Decreasing the production of these cytokines could also decrease tissue damage.<sup>8,19,18</sup>

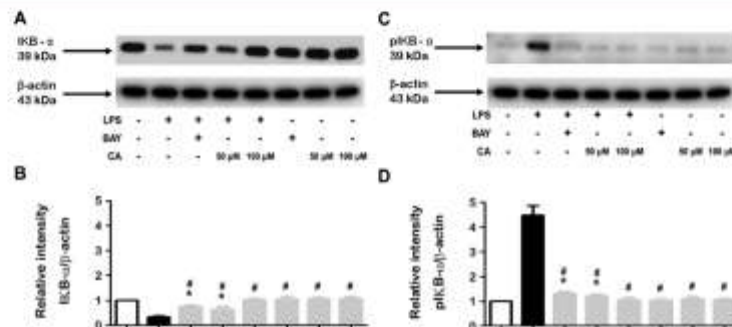
Another important molecule in inflammatory diseases is COX, particularly COX-2. This is a classic therapeutic target

for the design of anti-inflammatory drugs, especially NSAIDs. These bind to hydrogen bonds at polar position 120 on arginine, blocking the COX catalytic site, resulting in decreased enzyme activity and prostanoid synthesis.<sup>19</sup> COX-2 activity was also evaluated, where CA significantly decreased COX-2 activity 2.5-fold. The latter was similar in manner to that of Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, compared to the group stimulated with LPS, which increased its activity 5-fold (Figure 3A).<sup>21</sup> The effect of CA on COX-2 activity could be due to the interaction with its catalytic site.

Alternatively, CA could lower expression levels and COX-2 protein. Both mRNA expression and protein were evaluated, and it was observed that CA affected both the expression and the protein content of COX-2. A 3-fold decrease in mRNA expression levels was detected in the CA groups compared to the LPS group (Figure 3B). Furthermore, CA decreased



**Figure 5.** Effect of CA on p65. RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); the medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 25 min. The levels of nonphosphorylated and phosphorylated p65 in Ser536 protein were determined by Western blot (A, C). The relative intensity of nonphosphorylated and phosphorylated p65 was calculated by densitometry analysis of the bands on the gel (B, D). Values are presented as means  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p$  < 0.05 compared to control; <sup>#</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.



**Figure 6.** Effect of CA on IKB- $\alpha$ . RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu$ M) or BAY 11-7085 (10  $\mu$ M); the medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu$ g/mL) was added during 25 min. The levels of nonphosphorylated and phosphorylated IKB- $\alpha$  in Ser32/36 protein were determined by Western blot (A, C). The relative intensity of nonphosphorylated and phosphorylated IKB- $\alpha$  was calculated by densitometry analysis of the bands on the gel (B, D). Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. \* $p$  < 0.05 compared to control; <sup>#</sup> $p$  < 0.05 compared to LPS.

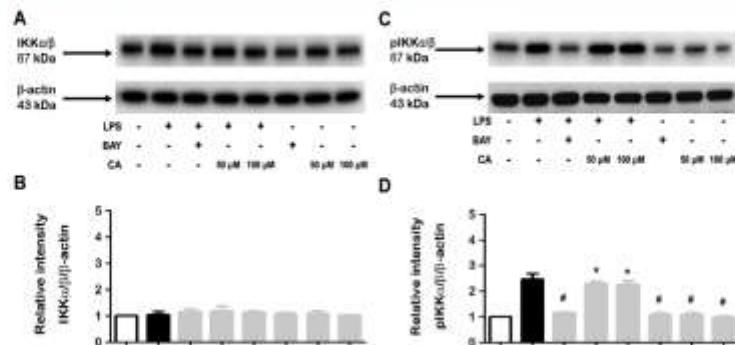
protein levels by 2-fold (Figure 3C and D). These results suggest that perhaps the decrease in COX-2 activity is not due to the blocking of the catalytic site of this enzyme. The decrease in COX-2 activity could be generated by the decrease in its expression that leads to a lower protein concentration, resulting in less enzymatic activity. Molecular coupling between CA and COX-2 should be explored in subsequent studies.<sup>50–52</sup>

The decrease in the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and COX-2 suggests that CA could be generating its anti-inflammatory effect by inhibiting the activity of its transcription factor NF- $\kappa$ B. This was further evaluated by means of the electrophoretic mobility shift assay (EMSA), a technique for studying the activation of transcription factors, based on DNA–protein interactions.<sup>53,54</sup> LPS-stimulated macrophages increased NF- $\kappa$ B binding to DNA 2.5-fold. CA 50 and 100  $\mu$ M decreased NF- $\kappa$ B activation by 1.7- and 2.1-fold, respectively. BAY 11-7085, an upstream inhibitor of this signaling pathway, decreased similarly to the group pretreated with 100  $\mu$ M CA.

To determine whether the observed effect is directly on the NF- $\kappa$ B dimer or on the upstream signaling pathway,

phosphorylated and total p65 levels were measured by Western blot. The p65 subunit is the most abundant in the NF- $\kappa$ B complex, which is phosphorylated during the first 25 min after cells are stimulated with LPS. Macrophages pretreated with BAY 11-7085 and 100  $\mu$ M CA and subsequently stimulated with LPS increased the phosphorylation of the p65 subunit up to 0.1- and 0.2-fold, respectively, and the group stimulated with LPS increased its phosphorylation up to 1.5-fold, compared to the control. Total p65 levels were similar in all groups (Figure 5), indicating that the treatments did not affect total p65 levels, but did affect their phosphorylation. Subsequently, the CA effect on other upstream proteins of this signaling pathway (IKB- $\alpha$  and the IKK complex) were evaluated.

IKB- $\alpha$  retains the NF- $\kappa$ B dimer (p50/p65) in the cytoplasm by masking its nuclear localization sequence and preventing its translocation into the nucleus. When IKB- $\alpha$  is phosphorylated, it becomes polyubiquitinated and breaks down. Consequently, NF- $\kappa$ B is released and translocated into the nucleus, joining the consensus sequence.<sup>55,56</sup> This relationship between phosphorylation and degradation was observed in the present investigation. LPS increased phosphorylation of IKB- $\alpha$  up to 3-fold, resulting in a 0.6-fold degradation for IKB- $\alpha$ . BAY 11-



**Figure 7.** Effect of CA on IKK- $\alpha/\beta$ . RAW 264.7 macrophages were pretreated during 1 h with CA (50 and 100  $\mu\text{M}$ ) or BAY 11-7085 (10  $\mu\text{M}$ ); the medium was removed, and fresh medium with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added during 25 min. The levels of nonphosphorylated and phosphorylated IKK- $\alpha/\beta$  in Ser176/177 protein were determined by Western blot (A, C). The relative intensity of nonphosphorylated and phosphorylated IKK- $\alpha/\beta$  was calculated by densitometry analysis of the bands on the gel (B, D). Values are presented as means  $\pm$  SEM from six independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to control; # $p < 0.05$  compared to LPS.

7085 and CA (50 or 100  $\mu\text{M}$ ) decreased IKB- $\alpha$  phosphorylation (3.2-fold) and inhibited IKB- $\alpha$  degradation (Figure 6).

Finally, the CA effect on IKK $\alpha/\beta$  phosphorylation was determined. CA treatment (50 and 100  $\mu\text{M}$ ) did not change the phosphorylation rate. LPS increased IKK phosphorylation up to 1.5-fold compared to the control and BAY 11-7085. IKK $\alpha/\beta$  total levels did not change in any of the groups (Figure 7). CA did not modify the IKK $\alpha/\beta$  complex, located upstream of the signaling. Therefore, the effects detected in NF- $\kappa\text{B}$  activation and p65 phosphorylation might be a consequence of direct actions of CA on IKB- $\alpha$  protein. These results are similar to those already reported for other anti-inflammatory terpenes, such as genipin, triptolide, and catalposide, inhibitors of IKB- $\alpha$ .<sup>18,25,26</sup>

These results might be associated with the anti-inflammatory effect of CA observed in the TPA model, because a decrease in the activation of the NF- $\kappa\text{B}$  pathway inhibits a large number of inflammatory mediators, reducing the inflammatory process and the generation of edema. It is noteworthy that CA might not have an effect only on macrophages. It could also have an effect on other important cells that participate in the inflammatory process, such as endothelial cells, in which NF- $\kappa\text{B}$  regulates the expression of adhesion molecules, as well as the generation of NO, among other functions, which future studies could corroborate.<sup>12,27</sup> It is also important to mention that CA could be working as a prodrug. This compound, when interacting with the culture medium or when administered directly into the mouse ear, could be reacting with sterases that are present, transforming these into cacalol.<sup>28</sup> Future pharmacokinetic studies could corroborate this theory.

In conclusion, CA affects the phosphorylation of IKB, which could be associated with the anti-inflammatory effect exhibited in the TPA model. This compound could be the basis for the synthesis of the next generation of anti-inflammatory drugs.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Cacalol Isolation and Acetylation.** *Psacalium decompositum* roots and rhizomes (500 g), generously donated by Dr. Manuel Jimenez-Estrada from Chemistry Institute at UNAM, were ground and extracted with hexane at room temperature for 48 h (hexane extract). Cacalol was isolated by chromatography onto a 70–230 mesh silica column (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as

previously described.<sup>21</sup> Cacalol was crystallized from hexane–acetone to yield white crystals (0.003% yield); mp 91–92  $^{\circ}\text{C}$ ;  $R_f$  0.51. Cacalol acetylation<sup>1</sup> was carried out to obtain CA with acetic anhydride in pyridine; mp 105–106  $^{\circ}\text{C}$ ;  $R_f$  0.63.<sup>21</sup> These data were corroborated with spectral analysis (IR,  $^1\text{H}$  NMR) of the reference compound and compared with those reported in the literature, establishing that both compounds were cacalol and CA (Supporting Information).<sup>30,31,33</sup>

**Mouse Ear Edema Model.** Eight-week-old male CD-1 mice (30–35 g) were used. The animals were provided by the Metropolitan Autonomous University and were maintained on a basic *ad libitum* diet for rodents with a 12 h light/dark cycle with a regulated temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ). The following studies were conducted in agreement with the national and international standards of the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1991), Regulation of the Autonomous Metropolitan University (DCBS.949.2017). The mice were randomly separated into four groups with five animals each. Edema was induced by topical administration of TPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the left ear of each mouse (2.5  $\mu\text{g}$  dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of acetone). Thirty minutes later, the right ear of each mouse was topically administered 25  $\mu\text{L}$  of acetone. In all cases, 1 mg of cacalol or CA was dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of the vehicle. The solvent and compounds were topically administered to both faces of each left ear treated with TPA. A control group received indomethacin (Sigma-Aldrich) (1 mg/ear) as a positive control in the ear treated with TPA. The animals were sacrificed 6 h after the treatment. A piece of atrial tissue was then removed by drilling a 7 mm hole at the center of the ear with a punch, in order to record its weight for further analysis. Quantification of the edema was calculated with the weight difference between the auricular atrial tissues treated with TPA and the corresponding tissue from the other ear that received only vehicle. Edema inhibition was defined as a percentage of the edema produced in control animals, with the following formula:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(w - w_0) - (w' - w_0')}{(w - w_0)} \times 100$$

where  $w$  = weight of the left ear with TPA (TPA control);  $w_0$  = weight of the right ear with vehicle (normal control);  $w'$  = weight of the left ear with TPA (treated); and  $w_0'$  = weight of the right ear with vehicle (untreated).

**RAW 264.7 Cell Culture.** RAW 264.7 cells lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). RAW 264.7 cells were cultured in monolayer culture using DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), and 2 mg/mL gentamicin (Invitrogen, Waltham,

MA, USA). The cells were cultured at 37 °C in disposable sterile plastic bottles (Corning, NY, USA) under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The medium was replaced three times a week and was utilized at 90% confluence.

**Cell Functionality by the Neutral Red Assay.** Cell functionality was measured using the Neutral Red assay (Sigma-Aldrich). The incorporated Neutral Red was directly proportional to the number of functional cells. RAW 264.7 cells were seeded on 24-well plates with a semiconfluent density (40 000 cells/well), treated with CA (10–120 μM) for 24 h, and incubated at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the plates were incubated for 2 h with a medium containing Neutral Red; then, the cells were washed and extracted from the dye to be read at 540 nm (Supporting Information).<sup>29</sup>

**TNF-α, IL-1β, and IL-6 Quantification.** RAW 264.7 cells were seeded on six-well plates and were incubated at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The cells were then preincubated with CA (50 and 100 μM) and BAY 11-7085 (10 μM) for 1 h before stimulation with LPS (1 μg/mL) for 3 h. The supernatants were collected and stored at -70 °C before analysis. The concentrations of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in the cell supernatants were determined by ELISA kits, according to the manufacturer's recommendations (BioLegend ELISA Max; BioLegend, San Diego, CA, USA).

**Cytokines (TNF-α, IL-1β, and IL-6) and COX-2 Relative Expression.** RAW 264.7 cells were seeded on six-well plates and were incubated at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then preincubated with CA (50 and 100 μM) and BAY 11-7085 (10 μM) for 1 h before stimulation with LPS (1 μg/mL) for 90 min. Total RNA was isolated with TriPure isolation reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). Single-strand complementary cDNA was synthesized with the ImProm II reverse transcription system kit (Promega Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. The cDNA was amplified with SYBR Green Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and employing the following primers: TNF-α (5'-CCTCCCTGTCATCAGTTCTA-3' R5'-ACTTGGTGGTTTGTCTACGAC-3', GenBank accession: NM\_013693.3); IL-1β (5'-TATGTCTTGC-CCGTGGAGCTT-3' R5'-GTCACAGAGGACGGGCTCTT-3', GenBank accession: NM\_009605.4); IL-6 (5'-TTCCATCCAGTTGGCTTCTT-3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3', GenBank accession: NM\_001314054.1); COX-2 (5'-TTCAAAAGAAGTGCCTGGAAAAGGT-3' R5'-GATCATCTCTACCTGAGTGTCTT-3', GenBank accession: NM\_011198.4) and housekeeping gene 36B4 (5'-AAGCGCTCCTGGCAT-TGCT-3' R5'-CCGACAGGGCAGCAGTGGT-3', GenBank accession: NM\_007475.2), as well as Fast Start enzyme, PCR buffer, and 3.5 mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 10 μL. Reactions were measured in a real-time Rotor-Gene (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia). qPCR was conducted using the following cycling conditions: preincubation and denaturation at 95 °C for 10 min. The threshold cycles (Ct) were measured in separate tubes in duplicate. The identity and purity of the amplified products were checked by electrophoresis on 2% agarose gel. The melting curve was analyzed at the end of amplification following the SYBER Green kit conditions, as indicated by the company (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Each assay included a negative control for each gene. The ΔCt values were calculated in every sample for each gene-of-interest as follows: Ct target - Ct reference (mRNA of reference remained stable throughout the experiments). Relative changes in the expression level of one specific gene (ΔΔCt) were calculated as the ΔCt of the test group minus the ΔCt of the control group and then presented as 2<sup>-ΔΔCt</sup>.<sup>30</sup>

**COX-2 Activity.** RAW264.7 cells were plated and incubated at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The cells were previously incubated with CA (50 and 100 μM) or BAY 11-7085 for 1 h before stimulation with LPS (1 μg/mL) for 3 h. Subsequently, the cells were harvested and washed twice with cold PBS and processed according to the manufacturer's protocol of the fluorimetric COX activity assay kit (Abcam, Cambridge, UK). The total amount of

COX activity (pmol/μg) per 5 μL sample was calculated according to the standard curve and the concentration of total protein, and the results were normalized with the untreated cells.

**Cytoplasmic and Nuclear Protein Extracts.** RAW264.7 cells were seeded on plates and incubated at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The cells were then preincubated with CA (50 and 100 μM) or BAY 11-7085 ((E)-3-(4-tert-butylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile) (10 μM) (Sigma Chemical) for 1 h before stimulation with LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) (1 μg/mL) for 25 min. The cells were subsequently harvested and washed twice with cold PBS. Subsequently, the cells were scraped in PBS, collected, and centrifuged at 330g for 5 min in order to recover the cell pellet. The latter was frozen in dry ice for 1 min and was gently resuspended in 100 μL of hypotonic solution (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT)) and centrifuged at 3300g at 4 °C; the supernatant was collected to obtain cytoplasmic proteins. The pellet containing cell nuclei was resuspended in 50 μL of hypertonic solution (10 mM Hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), incubated for 30 min, mixed gently at 4 °C, and centrifuged at 1340g for 10 min. The supernatants containing the nuclear proteins were collected and diluted 1:1 with an HDKE buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 50 mM KCl, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM of PMSF) and stored at 70 °C. Cytoplasmic and nuclear protein concentrations were determined using the Bradford method.<sup>31</sup>

**Western Blotting.** The cytoplasmic extract was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (BIO-RAD) with a glycine transfer buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl pH 8.8) and 10% methanol (v/v) overnight. The following day, the nonspecific sites were blocked with low-fat powdered milk (Svelty, 5% w/v); the membranes were incubated overnight with specific primary antibody IKK-α/β (1:2000; GeneTex, Irvine, CA, USA), phospho-IKKα/β (Ser 176/177) (1:2000; GeneTex), p65 (1:6000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), phospho-p65 (Ser 536) (1:2000 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), IKB-α (1:1500; Santa Cruz Biotechnology), phospho-IKB-α (Ser 32/36) (1:2000; Cell Signaling Technology), and β-actin (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology) diluted in TBS-Tween 1%–albumin 1% at 4 °C. After this, the membranes were incubated for 1 h with secondary antibodies (anti-rabbit-HRP (1:20 000; Pierce-Thermo, Waltham, MA, USA) and anti-mouse-HRP (1:10 000; Pierce-Thermo) at room temperature, and the proteins were detected employing the "Super-Signal" chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL, USA). The signals generated were detected using the equipment Fusion FX Viber Lourmat (VILBER Smart Imaging), and the spots were quantified by densitometry.

**Electrophoretic Mobility Shift Assay.** The nuclear extracts obtained were used as described previously. A double-stranded oligonucleotide with 21 base pairs containing 12 nucleotides of the consensus sequence for the binding site of the NF-κB consensus response elements (5'-AGTTGA- GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-3'; Santa Cruz Biotechnology) was labeled with γ<sup>32</sup>P-ATP (NEN, 6000 Ci/mmol). The reaction was carried out in the presence of T4 kinase (Boehringer Mannheim, Germany), with incubation at 37 °C for 30 min, and stopped by heating at 65 °C for 15 min, followed by the addition of 30 μL of Tris-borate buffer-EDTA (1× TBE, Sigma-Aldrich). The sample remained frozen until use. The samples were run in 7.5% acrylamide gels under nonreducing conditions. Binding of the pre-labeled probe to the NF-κB factor present in the nuclear extracts was carried out with 10 μg of nuclear extracts, 1 μg of poly dI/dC, 1 μg of pd (N) 6, and 10 μg of bovine serum albumin. The incubation was performed in HDKE buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, and 5 mM DTT). The labeled probe was added at the end to start the binding reaction. After 10 min at room temperature, the reaction was stopped by adding a Ficoll solution at 15% supplemented with Phenol Blue electrophoresis dyes. The reaction mixtures were separated into a gel with 1× TBE at 100 V for 120 min. The gel was dried and exposed to a phosphorus storage



screen (Molecular Dynamics, San Francisco, CA, USA), which was read in a Storm 850 phosphorimager (Molecular Dynamics). The image was developed in a Typhoon 9400 (Molecular Dynamics/GE) and analyzed with ImageQuant software (Molecular Dynamics).

**Statistical Analysis.** Data are shown as mean  $\pm$  SEM. An ANOVA and a post hoc Tukey–Kramer test were performed. Statistical analysis was carried out with GraphPad Prism ver. 6 software. A value of  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00300>.

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR for cacalol acetate and cell functionality (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

J. C. Almanza-Pérez – Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de CBS, UAM-Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México; [orcid.org/0000-0002-9417-5500](https://orcid.org/0000-0002-9417-5500); Phone: +52 55 58046483; Email: [jcap@xanum.uam.mx](mailto:jcap@xanum.uam.mx); Fax: +52 55 58044727

### Authors

B. Mora-Ramiro – Posgrado en Biología Experimental, División de CBS, UAM-Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

M. Jiménez-Estrada – Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, 04510 Ciudad de México, México

A. Zentella-Dehesa – Programa Institucional de Cáncer de Mama, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510 Ciudad de México, México; Unidad de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14080 Ciudad de México, México

J. L. Ventura-Gallegos – Programa Institucional de Cáncer de Mama, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510 Ciudad de México, México; Unidad de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14080 Ciudad de México, México

L. E. Gómez-Quiróz – Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, UAM-Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

W. Rosiles-Alanis – Posgrado en Biología Experimental, División de CBS, UAM-Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

F. J. Alarcón-Aguilar – Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de CBS, UAM-Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00300>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

B.M.R. had a scholarship from CONACyT (CVU 635901) to perform her Ph.D. in Experimental Biology at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. We would like to thank the Divisional Laboratory of Molecular Biology and UMADI of the CBS at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico, for technical assistance. This research was partially

supported by special program support to the investigation, UAM-2019 and PRODEP-SEP.

## ■ REFERENCES

- Medzhitov, R. *Cell* **2010**, *140* (6), 771–6.
- Schetter, A. J.; Heegaard, N. H.; Harris, C. C. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (1), 37–49.
- Abiodun, O. O.; Rodriguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Utrilla, M. P.; et al. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *192*, 309–19.
- Kishore, N.; Kumar, P.; Shanker, K.; Verma, A. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 272–309.
- Siczek, K.; Zatorski, H.; Chmielowiec-Korzeniowska, A.; Pulit-Prociak, J.; Smiech, M.; Kordek, R.; et al. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 538.
- Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S. A.; Mardani, F.; et al. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233* (9), 6425–40.
- Park, Y. D.; Jin, C. H.; Choi, D. S.; Byun, M. W.; Jeong, I. Y. *Arch. Pharmacol. Res.* **2011**, *34* (8), 1277–82.
- Tursi, A.; Elisei, W. *Mediators Inflammation* **2019**, *2019*, 8328490.
- Gautam, R.; Jachak, S. M.; Saklani, A. J. *Ethnopharmacol.* **2011**, *133* (2), 928–30.
- Chovatiya, R.; Medzhitov, R. *Mol. Cell* **2014**, *54* (2), 281–8.
- Dai, B.; Wei, D.; Zheng, N. N.; Chi, Z. H.; Xin, N.; Ma, T. X.; et al. *Cell. Physiol. Biochem.* **2019**, *51* (6), 2523–35.
- Yang, X.; Chang, Y.; Wei, W. *Mediators Inflammation* **2016**, *2016*, 6813016.
- Lee, S. Y.; Kim, H. J.; Han, J. S. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2013**, *18* (1), 23–9.
- Medzhitov, R. *Semin. Immunol.* **2007**, *19* (1), 1–2.
- Nonnenmacher, Y.; Hiller, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 2093.
- Oliveira, W. N.; Ribeiro, L. E.; Schrieffer, A.; Macsado, P.; Carvalho, E. M.; Bucellar, O. *Cytokine+* **2014**, *66* (2), 127–32.
- Haque, M. A.; Jantan, I.; Harikrishnan, H. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *55*, 312–22.
- Oliviero, F.; Scanu, A.; Zamudio-Cuevas, Y.; Punzi, L.; Spinella, P. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98* (5), 1653–9.
- Chen, J.; Wu, W.; Zhang, M.; Chen, C. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *70*, 274–83.
- Liu, X.; Moon, S. H.; Jenkins, C. M.; Sims, H. F.; Gross, R. W. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (10), 1217–27.
- Thompson, P. A.; Ashbeck, E. L.; Roe, D. J.; Fales, L.; Buckmeier, J.; Wang, F.; et al. Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomas: Results of a Suspended Randomized Controlled Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108* (12), DOI: 10.1093/jnci/djw151.
- Roth, S. H. *Drugs* **2012**, *72* (7), 873–9.
- Ryu, H. W.; Lee, S. U.; Lee, S.; Song, H. H.; Son, T. H.; Kim, Y. U.; et al. *Cytokine+* **2017**, *91*, 57–64.
- Siddiqui, F.; Naqvi, S.; Abidi, L.; Faiz, S.; Lubna; Avesi, L.; et al. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *182*, 221–34.
- Garg, N.; Luzzatto-Knaan, T.; Melnik, A. V.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Floros, D. J.; Petras, D.; et al. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34* (2), 194–219.
- Salmiinen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaamiranta, K.; Huuskonen, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (19), 2979–99.
- Staniek, A.; Bouwmeester, H.; Fraser, P. D.; Kayser, O.; Martens, S.; Tissier, A.; et al. *Biochem. J.* **2013**, *455* (1), 1159–71.
- Blackburn, D. F.; Gill, M.; Krol, E.; Taylor, J. *J. Pharm. Pract.* **2017**, *30* (6), 590–2.
- Wang, Y.; Zhang, X.; Zhao, L.; Shi, M.; Wei, Z.; Yang, Z.; et al. *J. Surg. Res.* **2017**, *220*, 40–5.
- Alarcón-Aguilar, F. J.; Roman-Ramos, R.; Jiménez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R.; González-Paredes, B.; Flores-Saenz, J. L. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *55* (3), 171–7.

- (31) Anaya, A. L.; Hernandez-Bautista, B. E.; Torres-Barragan, A.; Leon-Cantero, J.; Jimenez-Estrada, M. *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22* (3), 393–403.
- (32) Alarcon-Aguilar, F. J.; Jimenez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R.; Roman-Ramos, R. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72* (1–2), 21–7.
- (33) Jimenez-Estrada, M.; Chilpa, R. R.; Apan, T. R.; Liedias, F.; Hansberg, W.; Arrieta, D.; et al. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105* (1–2), 34–8.
- (34) Joseph-Nathan, P.; Negrete, M. C.; Gonzalez, M. P. *Phytochemistry* **1970**, *9* (7), 1623–8.
- (35) Castillo-Arellano, J. I.; Gomez-Verjan, J. C.; Rojano-Vilchis, N. A.; Mendoza-Cruz, M.; Jimenez-Estrada, M.; Lopez-Valdes, H. E.; et al. Chemoinformatic Analysis of Selected Cacalolides from *Psacalum decompositum* (A. Gray) H. Rob. & Brettell and *Psacalum peltatum* (Kunth) Cass. and Their Effects on FcεpsilonR1-Dependent Degranulation in Mast Cells. *Molecules* **2018**, *23* (12), 3367.
- (36) Jimenez-Estrada, M.; Merino-Aguilar, H.; Lopez-Fernandez, A.; Rojano-Vilchis, N. A.; Roman-Ramos, R.; Alarcon-Aguilar, F. J. Chemical characterization and evaluation of the hypoglycemic effect of fructooligosaccharides from *Psacalum decompositum*. *J. Complementary Integr. Med.* **2011**, *8*, DOI: 10.2202/1553-3840.1413.
- (37) Kong, Y. H.; Xu, S. P. *Oncol. Rep.* **2018**, *39* (6), 2513–26.
- (38) Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. J. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2014**, *1843* (11), 2563–82.
- (39) Barbosa, L. A. G.-S.; Redondo, P. A.; Oliveira, S.; Montesano, G.; De Souza, W.; Morgado-Díaz, J. A. *Cell Tissue Res.* **2003**, *312* (3), 319–31.
- (40) Garg, R.; Ramchandani, A. G.; Maru, G. B. *Carcinogenesis* **2008**, *29* (6), 1249–57.
- (41) Luo, D.; Moller, B. L.; Pateraki, I. *Chimia* **2017**, *71* (12), 851–8.
- (42) Park, D. R.; Ko, R.; Kwon, S. H.; Min, B.; Yun, S. H.; Kim, M. H.; et al. *J. Med. Food* **2016**, *19* (12), 1196–203.
- (43) Brandenburg, K. H.; Correa, W.; Fukuoka, S.; Gutschmann, T.; Zähringer, U.; Koch, M. H. *J. Struct. Biol.* **2016**, *194* (1), 68–77.
- (44) Fullerton, J. N.; Gilroy, D. W. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15* (8), 551–67.
- (45) Rea, I. M.; Gibson, D. S.; McGilligan, V.; McNerlan, S. E.; Alexander, H. D.; Ross, O. A. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 586.
- (46) Zwicker, P.; Schultze, N.; Niehs, S.; Albrecht, D.; Methling, K.; Wurster, M.; et al. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *40*, 45–54.
- (47) Singha, B.; Gatla, H. R.; Phyu, S.; Patel, A.; Chen, Z. S.; Vancurova, I. *Oncotarget* **2015**, *6* (28), 26347–58.
- (48) Medler, J.; Wajant, H. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23*, 295.
- (49) Ferrer, M. D.; Busquets-Cortes, C.; Capo, X.; Tejada, S.; Tur, J. A.; Pons, A.; et al. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26* (18), 3225–41.
- (50) Berk, K.; Deygalski, K.; Harasim-Symbor, E.; Charytoniuk, T.; Blowska, N.; Lukaszuk, B.; et al. *Life Sci.* **2019**, *221*, 341.
- (51) Mitchell, J. A.; Kirkby, N. S. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1038.
- (52) Woodward, D. F.; Wang, J. W.; Ni, M.; Bauer, A.; Martos, J. L.; Carling, R. W.; et al. *FASEB J.* **2017**, *31*, 368.
- (53) Hellman, L. M.; Fried, M. G. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (8), 1849–61.
- (54) Seo, M.; Lei, L.; Egli, M. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2019**, *76* (1), e70.
- (55) Arulsevan, P.; Fard, M. T.; Tan, W. S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Norhaizan, M. E.; et al. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2016**, *2016*, 5276130.
- (56) Baker, R. G.; Hayden, M. S.; Ghosh, S. *Cell Metab.* **2011**, *13* (1), 11–22.
- (57) Zhang, C.; Wen, R.; Ma, X. L.; Zeng, K. W.; Xue, Y.; Zhang, P. M.; et al. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 866.
- (58) Heikkinen, E. M.; Del Amo, E. M.; Ranta, V. P.; Urtti, A.; Vellonen, K. S.; Rapponen, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *123*, 106–10.
- (59) Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125.
- (60) Almanza-Perez, J. C.; Alarcon-Aguilar, F. J.; Blancas-Flores, G.; Campos-Sepulveda, A. E.; Roman-Ramos, R.; Garcia-Macedo, R.; et al. *Bioméd. Pharmacother.* **2010**, *64* (8), 534–40.
- (61) Kruger, N. J. *Methods Mol. Biol.* **1994**, *32*, 9–15.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00720  
Matrícula: 2143800955

ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL  
ACETATO DE CACALOL SOBRE LA  
VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NF- $\kappa$ B  
ACTIVADA POR LPS

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de septiembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO  
DR. ELI TERAN CABANILLAS  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: BEATRIZ MORA RAMIRO

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

Aprobar

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

